

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

#5  
J81462  
11/29/01  
JC872 U.S. PRO  
09/995691

Applicant(s): SHIN, Joon Shik et al.

Application No.:

Group:

Filed: November 29, 2001

Examiner:

For: USE OF HARPAGID-RELATED COMPOUNDS FOR PREVENTION AND  
TREATMENT OF OSTEOPOROSIS, ARTHRITIS AND RUPTURED DISC AND  
PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Box Patent Application  
Washington, D.C. 20231

November 29, 2001  
0662-0163P

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the  
applicant hereby claims the right of priority based on the following  
application(s):

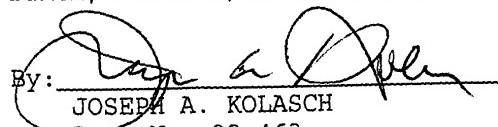
<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
REPUBLIC OF KOREA	2000-71497	11/29/00

A certified copy of the above-noted application(s) is(are)  
attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this,  
concurrent, and future replies, to charge payment or credit any  
overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees  
required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly,  
extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By:   
JOSEPH A. KOLASCH  
Reg. No. 22,463  
P. O. Box 747  
Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment  
(703) 205-8000  
/sll

SHIN, Jun Sik et al.  
November 29, 2001  
BSKB, LLP  
(703) 205-8000  
0662-0163P

1 of

JG872 U.S. PTO  
09/995691  
11/29/01

대한민국 특허청  
KOREAN INTELLECTUAL  
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 71497 호  
Application Number PATENT-2000-0071497

출원년월일 : 2000년 11월 29일  
Date of Application NOV 29, 2000

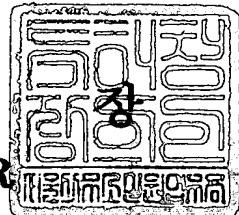
출원인 : 신준식  
Applicant(s) SHIN, Jun Sik

2001 년 11 월 03 일



특허청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2000.11.29
【발명의 명칭】	하르파지드관련 화합물의 골다공증, 관절염 및 디스크의 예방과 치료제로서의 용도 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성을 Use of harpagide-related compounds for prevention and treatment of osteoporosis, arthritis and ruptured disc and pharmaceutical compositions containing the same
【발명의 영문명칭】	
【출원인】	
【성명】	신준식
【출원인코드】	4-1998-022399-0
【대리인】	
【성명】	박사룡
【대리인코드】	9-1998-000198-9
【포괄위임등록번호】	2000-065384-2
【발명자】	
【성명】	신준식
【출원인코드】	4-1998-022399-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김상태
【성명의 영문표기】	KIM,Sang-Tae
【주민등록번호】	620321-1898824
【우편번호】	132-030
【주소】	서울특별시 도봉구 쌍문동 349-15 두산그린빌라 401호
【국적】	KR
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 박사룡 (인)

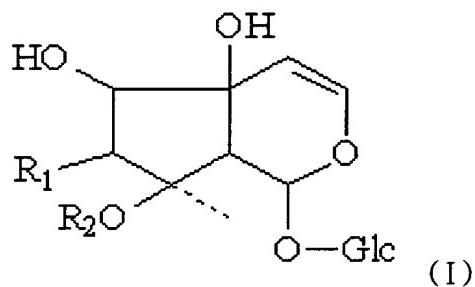
**【수수료】**

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	48	면	48,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】		77,000 원	
【감면사유】		개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】		23,100 원	
【첨부서류】		1. 요약서·명세서(도면)_1통	

### 【요약서】

#### 【요약】

본 발명은 다음 일반구조식 (I)의 화합물이 골다공증, 관절염 및 디스크치료에 탁월한 효능을 가지는 것을 발견하였으며, 따라서 이 화합물은 골다공증, 관절염 및 디스크질환의 예방과 치료에 사용될 수 있고, 이를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 통상으로 허용되는 부형제, 보조제, 희석제, 등장화제, 보존제, 활탁제, 용해보조제와 함께 약제학적으로 통상으로 허용되는 방법으로 약제학적으로 통상으로 허용되는 제제형태로 제제화한 골다공증, 관절염 및 파열된 디스크에 탁월한 효능을 가지는 약학적 제제를 제공한다.



상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일기이다.

#### 【대표도】

도 4

#### 【색인어】

하르파지드, 하르파고시드, 골다공증, 관절염, 디스크

**【명세서】****【발명의 명칭】**

하르파지드관련 화합물의 골다공증, 관절염 및 디스크의 예방과 치료제로서의 용도 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물{Use of harpagide-related compounds for prevention and treatment of osteoporosis, arthritis and ruptured disc and pharmaceutical compositions containing the same}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 구성약제로부터 증류수 및 유기 용매로 추출, 감압 농축, 동결 건조한 의약 조성물의 건조중량을 회수하는 공정에 관한 것이며(a), 유효약물의 추출 과정에 따르는 유기용매 분획 추출방법을 나타낸 것이다(b).

도 2는 골질환에서 대표적인 관절염의 유발부위인 관절에서의 발병원인기전 (a), 부위(b), 발병과정의 문자생물학적 신호전달 경로에 관한 것이다(c).

도 3은 환자로부터 만성 및 퇴행성 골질환인 대표적인 관절염의 유발부위인 관절에서의 활액세포의 생존 및 세포형태학적 양상을 나타낸 것이다.

도 4는 의약 조성물의 유기용매 분획인 각 분획물을  $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 2주간 경구투여 처리하여 관절염의 만성 및 퇴행성 골질환 증상의 한 부분인 부종을 유도 후 70일간 부종억제 현상을 나타낸 것이다.

도 5는 유효약물인 유기용매를  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 처리하여 수정란에 2일간  $37^\circ\text{C}$  항온배양기에 배양한 후 활액세포를  $5 \times 10^3$  세포수로 CAM상에 조심해서 주사기로 주입하여 3일간 관찰하여 나타난 CAM의 수와 분포양상을 나타낸 것이다

도 6은 의약 조성물인 물추출물을 도 9의 농도로 관절염의 유도쥐에 처리하여 70일 경과후, 연골조직의 파괴정도를 H/E 조직염색을 나타낸 것이다.

도 7은 의약 조성물인 단방약제의 유기용매 분획물을  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 24시간 처리하여 Raw264.7 세포주에 LPS를 자극하여 NO생성을 억제하는지를 나타낸 막대 그래프이며(a) 상기방법에 의해 유기 용매 분획물인 CBB분획분과 LNE분획분에 대하여 LPS를 자극하여 NO생성을 억제 하는지를 나타낸 막대 그래프이다(b).

도 8은 유효약물인 유기 분획물을 약  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도 처리후 Raw 264.7 세포주에 LPS를 자극하여 세포사를 유도하는지의 현상을 나타낸 것이며(a), 동 방법에 근거하여 활액세포상에서도 동일한 양상이 나타나는지를 관찰한 것이다(b).

도 9은 유효약물인 유기 분획물을 약  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도 처리후 Raw 264.7 세포주에 LPS를 자극하여 세포주기에 미치는 영향을 flow cytometry 분석을 실시한 것이다(a), 동 방법에 근거하여 활액막 세포상에서도 동일한 양상이 나타나는지를 관찰한 것이다(b).

도 10은 유효약물인 유기용매를 통해 활액세포주에 LPS를 자극하여 SDS-PAGE electrophoresis을 실시하여 COX-II 효소 단백질의 발현을 억제하는 것인지를 나타낸 것이다.

도 11은 유효약물인 유기용매를 통해 활액세포주에 LPS를 자극하여 RT-PCR을 실시하여 iNOS와 COX-II 효소 합성을 억제하는 것을 나타낸 것이며(a). 동일 방법으로 각 분획에서 iNOS(b)와 COX-II 효소 합성을 억제하는 것을 나타낸 것이다(c).

도 12은 의약 조성물의 활성 성분으로 확인된 상기의 화합물이 관절내 활액막 세포의 COX-II를 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 세포를 2차 항체인 FITC 를 표지하여 호일로 빛을 차광하여 이를 1시간정도 방치한 다음 이를 형광현미경에서 관찰한 것이다.

도 13은 의약 조성물의 유기용매 분획인 각 분획물을  $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 2주간 경 구투여하여 처리하여 관절염의 만성 및 퇴행성 골질환 증상의 한 부분인 부종을 유도 후 70일간 부종억제 현상을 나타낸 것을 x-ray로 사진촬영한 결과이다.

도 14은 의약 조성물을 내원환자의 disc 환자를 대상으로 임상적인 개선 효과를 CT 촬영한 결과이다.

도 15은 의약 조성물의 양근탕과 청파전을 내원환자의 disc 환자를 대상으로 임상적인 개선효과를 MRI 촬영한 결과이다.

도 16은 내원환자의 disc 환자를 대상으로 척추신경 마비현상의 기전에 대한 nogo-A의 존재부위에 대한 그림이다.

도 17은 신경전달 마비에 관한 신경부위인 axon 주위에 존재하는 oligodendrocyte에서 injury가 야기되고 nogo-A가 분비하므로 신경전달이 차단되는 경로를 나타낸 것이다.

도 18은 신경전달 마비에 관한 신경부위인 axon 주위에 존재하는 oligodendrocyte에서 injury가 야기되는 것처럼 nogo-A를 발현시킨 뇌세포에 신경전달이 차단되는 경로를 나타낸 것이고(a), NGF나 CBB-13/LNE-2를 처리시 신경전달이 원상태로 복귀되는 neutrite가 재생되어 신경전달이 복귀되는 양상을 나타낸 것이다(b).

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <19> 본 발명은 하르파지드 관련 화합물의 관절염, 골다공증 및 디스크치료제로서의 용도 및 이 하르파지드 관련 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <20> 현재 우리나라에서 다양한 골질환으로 호소하는 경우가 매년 증가 추세인 것으로 알려져 있다. 그러나 골질환 치료를 목적으로 사용하는 화학요법, 수술요법 등은 아직 완벽한 성과를 거두지 못한 형편이다. 이러한 골질환은 노화로 인한 만성 내지 퇴행성으로 진행되고 그에 따르는 고통뿐만 아니라 의료 부담이 많이 차지하고 있어 임상 분야에 전반적으로 활용할 수 있는 신물질의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다.

- <21> 성인병 및 노인성 질환으로 알려진 류마티스성 관절염과 퇴행성 관절염은 난치성질환으로 알려져 있으며(도 2 a), 이 질환들은 관절의 활액세포의 활성화와 그로 인한 노화 및 자가면역에 의한 요인에 기인한 발병기전이 알려져 있다(도 2

b). 관절염 세포를 사멸 또는 억제하거나 또는 이 세포가 생성하는 효소인 사이클로옥시젠에이스 II(cyclooxygenase II, COX-II)(도 c)의 발현을 억제 또는 저해하는 약물을 개발하므로서 류마チ스성과 퇴행성 관절염을 치유할 수 있다고 예측된다.

<22> 본 발명자들이 개발한 한방약제에 함유되어 있는 구성약제들은 한의학적으로 조혈, 강장, 이뇨, 골수형성, 보신, 보양, 산전후 관절, 요통, 건위, 소염, 활혈거습, 거풍, 해독, 지혈, 갱년기 장애, 통경, 자양, 보혈기능 등 다양한 효능이 있는 것으로 동의보감와 신농본초경에 수록되어 있으며 기타 효능에 대해 고대문헌에 기록되어 있다.

<23> 전세계적으로 골질환에 관한 연구가 활발히 진행되고, 이에 따라 골수내 일련의 면역지식이 급증함에 따라 골질환의 병인과 관절염의 발병기전이 밝혀져 최근에 몇가지 골다공증 치료제가 개발되고 알렌드레이드(alendrate), 타목시펜(Tamoxifen), 비타민D<sub>3</sub>(Vitamin D<sub>3</sub>), 부갑상선(parathyroid hormone: PTH) 그리고 류마티스 관절염 치료제로 COX-II 저해제가 이미 상품화에 성공하였는데 항소염제인 살파살라진(sulfasalazine)(Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Muller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. Eur. J. Biochem., 2000 Oct 15;267(20):6118-6125), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(a pathophysiological factor and drug target. Eur. J. Biochem. 2000 Oct 15;267(20):6118-6125 등이 알려져서 임상 내지 연구개발 중에 있는 실정이며, 한편 골다공증 치료제로 써는 알렌드로네이트(alendronate), 라록시펜(raloxifene), 칼시토닌(calcitonin)(Moraghan TJ, Perez EA. Mayo Clin

Proc. 2000 Aug;75(8):821-9.), estradiol(An-dersson TL, Stehle B, Davidsson B, Hoglund P. Maturitas. 2000 Jun 30;35(3):245-52), 게니스테인 (genistein)(Mazurek AP. Polkowski K. Acta Pol Pharm. 2000 Mar-Apr;57(2):135-55., 1,25-디하이드록시바이타민 D<sub>3</sub> (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) (Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2000 Jul;279(1):E213-20), 파라타이로이드 포르몬(parathyroid hormone)(Hunziker J, Wronski TJ, Miller SC. J. Dent. Res. 2000 Jun;79(6):1431-8), alendronate(Kashyap AS, Kashyap S. Postgrad Med J. 2000 Jul;76(897):417-8), estrogen receptor modulators, calcitonin, and bisphosphonates( Wimal-awansa SJ. J. Clin. Densitom. 2000 Summer;3(2):187-201)에 의해 알려져 있다.

<24> 따라서 본 발명자들은 아직까지 상기 약물들이 임상적으로 적용하는 문제와 독성 부작용이 문제가 되고 있는 실정에서 생약인 천수근에 대하여 용매분획을 얻고 각 분획에 대하여 관절 활액막세포의 증식 억제작용을 관찰한 결과 천수근의 에칠아세테이트 분획(LNE분획) 및 부탄올 분획(LNB분획)이 유효함을 입증하였다.

<25> 천수근은 아프리카 칼라하리사막에 서식하는 일명 '악마의 발톱'(

*Harpagophytum procumbens* DC.)이라는 별명을 가지고 있으며 근경을 아프리카와 유럽에서 민간약으로 관절염에 사용하고 있는 [Schmidt, S. ; Rothenfelde, B., The great significance of *Harpagophytum* root. *Zeitschrift fur Naturheilkunde.* 22, 48(1978). Seeger, P. C., *Harpagophytum*, an effective plant remedy. *Erfahrungsheilkunde*, vol. 8, 1978. Soulimani, R. ; Younos, C. ; Mortier, F. ; Derrieu, C., The role of stomachal activity of plant extracts, using as an example extracts of 72(12), 1532] Pelangiaceae과 식물이다. 천수근의 성분으로는 하르파지드(harpagide), 하르파고시드(harpagoside), 프로쿰비드 (procumbide)[Kapf, R., *Schweiz. Apoth.-Ztg.*, 114, 377(1976). Sticher, O., 117. 1279(1977). Caprasse, M., *J. Pharm. Belg.*, 35, 143(1980).], 8-O-(파라-쿠마노일)-하르파지드[8-O-(p-coumaroyl)-harpagide], 6'-O-(파라-쿠마노일)-프로쿰비드[6'-O-(p-coumaroyl)-procumbide], 프로쿰보시드(procumboside)가 알려져 있으며[Kikuchi, Tohru ; Matsuda, Satoko ; Kubo, Yoko ; Namba, Tsuneo, New iridoid glucosides from *Harpagophytum procumbens* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(7), 2296(1983)] 이들 성분의 약리작용은 알려져 있지 않다.

<26> 본 발명자들은 천수근의 유효분획인 에틸아세테이트 분획(LNE분획)와 부탄올 분획(LNB분획)을 합치고 실리카겔에서 크로마토그래피를 실시하여 LN-1, LN-2, LN-3를 각각 분리·정제하였다. 화학구조를 규명한 결과 LN-1은 하르파고시드(harpagoside), LN-2는 스타키오스(stachyose), LN-3는 하르파지드(harpagide)

임을 동정하였다. 하르파고시드와 하르파지드는 천수근에서 이미 분리·보고된 화합물이며 [von H. L.ichti:; A. von Wartburg, Die struktur des Harpagosides. Helvetica Chinica Acta, 49, Fasciculus 5, 1552(1996)], 스타키오스는 면실과 대두에 그 함량이 비교적 많은 사당류의 일종으로(김동훈 저, 식품화학, 185쪽, 1978, 탐구당), 금회 천수근에서는 본 발명자들이 처음으로 분리한 것이다.

<27> 본 발명자들은 천수근에서 분리·정제한 화합물에 대하여 항관절염에 유효성을 검정하였다. 그 결과 LN-3(하르파지드)가 가장 약효가 뛰어났고 LN-1(하르파고시드)는 중정도의 약효가 있음을 입증하였다. 또한 하르파고시드를 알카리성에서 가열하면 하르파지드가 얻어진다는 사실은 이미 알려져 있었으나[Kikuchi, Tohru ; Matsuda, Satoko ; Kubo Yoko ; Namba, Tsuneo, New iridoid glucosides from *Harpagophytum procumbens* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(7), 2296(1983)], 금회 본 발명자들은 알카리성에서 가열하지 않고 실온에서도 하르파고시드로부터 하르파지드가 생성된다는 결과를 얻었다.

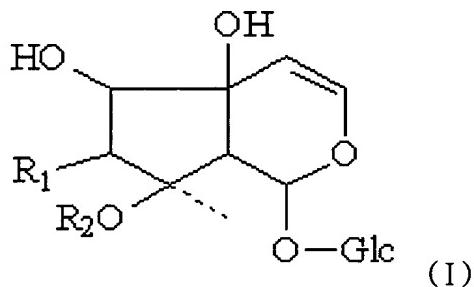
<28> 그러나, 하르파고시드나 하르파지드가 항관절염효과나 골다공증 또는 파열된 디스크 치료에 약효가 있다는 사실은 밝혀진 바 없다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<29> 본 발명자들은 기지물질이며, 천수근의 구성성분인 하르파지드와 하르파고시드가 항관절염 효과가 매우 탁월하다는 사실, 골다공증에 효능이 있다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

<30> 따라서, 본 발명의 목적은 다음 일반구조식 (I)의 하르파지드 관련 화합물의 관절염, 골다공증 및 파열된 디스크에 대한 약학적 용도를 제공하는 것이다.

&lt;31&gt;



<32> 상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일 기이다.

<33> 상기식에서,  $R_1$ 이 메틸이고,  $R_2$ 가 신나모일인 화합물이 하르파고시드이고,  $R_1$ 이 메틸이고  $R_2$ 는 수소원자인 화합물이 하르파지드이다.

<34> 본 발명의 다른 목적은 상기 일반구조식 (I)의 화합물을 주성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

<35> 본 발명의 또 다른 목적은 약효가 비교적 약한 하르파고시드를 약효가 강한 하르파지드로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

<36> 다음에 실험예 및 실시예로서 본 발명을 더욱 상세히 기재하며, 이들이 이 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<37> 실시예 1

<38> 천수근 1,205g에 70% 에탄올 8리터를 가하고 수욕상에서 6시간씩 4회추출하고 용매를 증발시켜서 천수근엑스 598g을 얻었다.

<39> 이 엑스를 물 1리터에 혼탁시키고 헥산(1리터x3회) 및 부탄올(1리터x3회)로 차례로 추출하였다. 각각의 추출액을 감압농축하였다. 에탄올 엑스 및 용매분획의 수율은 각각 598g, LNE 49g, LNB 85, LNW 456g이었다.(도 1b).

<40> 실시 예 2

<41> 천수근의 LNE 및 LNB 분획으로부터 화합물 LN-1, LN-2 및 LN-3의 분리

<42> LNE 46 g 및 LNB 81 g을 합하고 여기에 물 500 ml에 혼탁시키고 클로로포름/메탄올(CM) 2:1 용액 600ml를 가하여 혼합시킨 후 클로로포름층을 취하였다. 다시 CM 2:1용매로 2회 더 추출하여 클로로포름층을 취하였다. 클로로포름층을 모아 농축하여 38 g의 엑스(Fr.1)를 얻었고 수층을 농축하여 약 80 g의 엑스(Fr.2)를 얻었다. 클로로포름 엑스(Fr.1)를 실리카겔 칼럼에서 정제하고 세파텍스 LH-20(메탄올 용매)에서 재정제하여 화합물(12 g)을 얻었다. 수층 엑스(Fr.2)를 실리카겔 칼럼에서 CM 20:1→10:1→8:1→4:1→2:1 및 메탄올 용매로 크로마토그래피를 실시하였다. CM 10:1 용출액에서 화합물 LN-1(5.1g)을 다시 얻었다. 메탄올 용출액을 모아(6.5 g) 세파텍스 LH-20 칼럼에 50 % 아세톤 수용액으로 3회, 물을 용매로 크로마토그래피를 실시하여 화합물 LN-2(4.5 g)을 얻었다.

<43> 위의 CM 4:1 용출액을 모아 다시 실리카겔 칼럼에서 CM 4:1로 크로마토그래피를 실시하여 LN-3(0.36 g)을 얻었다. 화합물 LN-1, LN-2 및 LN-3는 각각 하르파고시드, 스타키오스 및 하르파지드였다.

<44> 1) LN-1(하르파고시드)

<45> 용점 : 120°C(무정형)

<46> MS  $m/z$ (%) : 148([C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 74.8), 147(79.1), 77(100)

<47> IR  $\nu$  <sup>KBr</sup>  $\text{max}$  (cm<sup>-1</sup>) : 3430(OH), 1690(C=O), 1638(C=C), 1578, 1561, 1543, 1508, 1499(benzen), 1186, 1119, 1074, 1015(C-O), 990, 955(CH=CH, trans), 770, 716, 685(CH=CH, cis)

<48> <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 1.53(3H, s, 10-H<sub>3</sub>), 2.02(1H, dd, J=4.2, 15 Hz, 7-H), 2.27(1H, dt, J=15, 1.2 Hz, 7-H), 2.94(1H, br.s, 9-H), 3.22(1H, dd, J=7.8, 9.0 Hz glc-2), 3.35(1H, d-like, J=9.9 Hz, glc-4), 3.36(2H, ddd, J=2.1, 5.1, 10 Hz, glc-5), 3.41(1H, dd, J=8.7, 9.3 Hz, glc-3), 3.72(1H, dd, J=5.7, 12 Hz, glc-6), 3.76(1H, dd, J=1.2, 4.2 Hz, 6-H), 3.93(1H, dd, J=2.4, 12 Hz, glc-6), 4.62(1H, dd, J=8.1Hz, glc-1), 4.94(1H, dd, J=1.5, 6.3 Hz, 4-H), 6.18(1H, d, J=1.2 Hz, 1-H), 6.41(1H, d, J=6.3 Hz, 3-H), 6.51(1H, d, J=15.9 Hz, C=CH-C=O), 7.38-7.42(3H, m, benzen-3H), 7.6-7.61(2H, m, benzen-2H), 7.67(1H, d, J=15.9 Hz, CH=C-C=O)

<49> 2) LN-2(스타키오스)

<50> 용점 : 148°C

<51> [  $\alpha$  ] <sup>D</sup> : +138.6

<52> <sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 3.33(2H, s,  $\beta$ -Fru(f)-1-H<sub>2</sub>), 4.20(1H, d, J=9.0 Hz,  $\beta$ -Fru(f)-3H), 4.97(2H, d, J=2.4 Hz, 2× $\alpha$ -Gal(p)-anomeric proton), 5.41(1H,

1020000071497

출력 일자: 2001/11/5

d, J=3.9 Hz,  $\alpha$ -Glu(p)-anomeric proton) (약어 :  $\beta$ -Fru(f),  $\beta$ -fructofuranosyl;  $\alpha$ -Gal(p),  $\alpha$ -glactopyranosyl;  $\alpha$ -Glu(p),  $\alpha$ -glucopyranosyl)

<53>  $^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 표 1

<54> 표 1. LN-2(스타키오스)의 핵자기공명데이터

<55>

위치	LN-2	표준품	위치	LN-2	표준품
			$\alpha$ -Glu(p)	$\alpha$ -Gal(p)	
1'	92.86	92.89	1'	99.13	93.7
2'	70.25	71.79	2'	69.20	69.9
3'	73.48	73.30	3'	70.25	70.2
4'	69.56	69.95	4'	70.10	70.2
5'	72.04	73.12	5'	71.75	71.7
6'	66.63	62.09	6'	67.24	62.5
$\beta$ -Fru(f)			$\alpha$ -Gal(p)		
1	63.22	63.08	1''	98.79	93.7
2	104.56	104.41	2''	69.04	69.9
3	82.10	82.09	3''	70.13	70.2
4	74.76	74.73	4''	70.00	70.2
5	77.12	77.16	5''	71.44	71.7
6	61.90	60.85	6''	62.20	62.5

<56> LN-2의 완전 산가수분해

<57> LN-2 (20 mg)에 4N HCl/다이옥산/벤젠(3:1:2) 혼합용액 2.4 ml를 가하여 100  $^{\circ}\text{C}$ 에서 한시간 가열하였다. 냉각 후 수층을 클로로포름/메탄올/물(30:20:5) 용액 실리카겔 판에서 TLC를 수행하였다. 그결과 과당/포도당/칼락토오스가 1:1:2 비율임을 동정할 수 있었다.

<58> LN-2의 부분 산가수분해

<59> LN-2 (500 mg)에 2N HCl/다이옥산/벤젠(3:1:2) 혼합용액 5.0 ml를 가하여 93°C에서 40분간 가열하였다. 냉각 후 반응액을 농축한 다음 세파텍스 G-25(용매 : 5 % 에탄올)로 분자여과를 하여 LN-21 (120 mg)을 동결건조하여 얻었다. LN-21을 위의 방법과 같이 완전 산가수분해를 시켜 TLC를 실시한 결과 과당은 검출되지 않고 포도당과 갈락토오스만 검출되었다.

<60> LN-21( $\alpha$ -디-갈락토파라노실(1'→6')- $\alpha$ -디-갈락토파라노실(1'→6)글루코파라노시드

<61>  $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}) \delta$  : 4.66(d,  $J=8.1$  Hz,  $\beta$ -Glu(p)-anomeric proton), 4.98(2H, m, 2  $\times$  $\alpha$ -Gal(p)-anomeric proton), 5.23(d,  $J=3.6$  Hz,  $\alpha$ -Gal(p)-anomeric proton)(4.66ppm 면적/5.23ppm 면적 비율 = 2.14)

<62> 3) LN-3

<63> 용점 : 120°C(무정형)

<64>  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$  : 1.24(3H, s, 10-H<sub>3</sub>), 1.79(1H, ddd,  $J=0.9, 4.2, 13.8$  Hz, 7  $\beta$ -H), 1.90(1H, dd,  $J=4.8, 13.8$  Hz, 7  $\alpha$ -H), 2.54(1H, br.s, 9-H), 3.21(1H, dd,  $J=7.8, 9.0$  Hz, 2'-H), 3.31(1H, 4'-H), 3.34(1H, m, 5'-H), 3.38(1H, t,  $J=9.0$  Hz, 3'-H), 3.66(1H, dd,  $J=5.7, 12.0$  Hz, 6'-H), 3.70(1H, t-like,  $J=\sim 4.5$  Hz, 6-H), 3.90(1H, dd,  $J=1.5, 12.0$  Hz, 6'-H), 4.57(1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'-H), 4.94(1H, dd,  $J=1.5, 6.3$  Hz, 4-H), 5.73(1H, d,  $J=0.9$  Hz, 1-H), 6.31(1H, d,  $J=6.6$  Hz, 3-H)

<65> 실시예 2

<66> 하르파고시드(LN-1)으로부터 하르파지드(LN-3)의 제조

<67> 하르파고시드(LN-1) 560 mg을 메탄올 20 ml에 녹이고 1N 가성소다 1 ml를 가하여 잘 섞은 다음 하룻밤 실온에 방치하고 세파텍스 LH-20(용매 : 80 % 메탄올) 칼럼을 통과시켰다. 용출액으로부터 하르파지드 400 mg과 신나민산 소다(sodium cinnamate) 125 mg을 얻었다.

<68> 실시예 3

<69> 실시예 2과 유사한 방법으로 1N 가성소다 대신에 2 % 탄산소다 수용액을 가하고 실시예 4과 같이 실시하여 하르파지드와 신나민산소다를 얻었다.

<70> 실시예 4

<71> 천수근으로부터 하르파지드의 다량제조

<72> 천수근 분말 1 Kg을 메탄올 20 L로 실온에서 4회 침출하고 침출액을 모아 감압하에 농축하여 얻은 메탄올 엑스 475 g을 정제수 1.5 L에 녹이고, 헥산 1.5 L로 3회 추출한 다음 수중에 5 % 가성소다 수용액 0.1 L를 가하여(pH 11.5~12.5) 잘 혼합한 후 실온에서 하룻밤 방치하였다. 이 반응액을 이소프로필알콜 2L씩 2회 추출하였다. 이소프로필알콜분획을 모아 정제수 1 L로 세척한 다음 이소프로필알콜총을 감압하에 농축하여 15 g의 분말을 얻었다. 이 분말을 95 % 에탄올로 평형화시킨 세파텍스 LH-20 칼럼(크기 10×100 cm)에서 크로마토그래피를 실시하였다. 하르파지드가 용출되는 분획(실리카겔 박층크로마토그래피, 용매 :

클로로포름/메탄올/물 70:30:4, Rf 값=0.31)을 모아 농축하여 하르파지드 12 g을 얻었다.

<73> 실험 예 1

<74> 관절염의 부종억제 효과

<75> 본 발명의 의약 조성물이 가지는 부종 억제효과를 관찰하기 위해 체중 200g 이내의 흰쥐를 실험군당 6마리를 대상으로 부종을 유도하기 위해 ZYMOSAN-A(20 mg/ml/KG) 0.5ml과 Freund's Adjuvant 0.5ml을 혼합하여 좌측 족삼리에 주사한 후 부종의 진행상태를 70일간 관찰하였는데 부종의 유도 전/후를 사진 촬영하였고 또한 물추출물 및 유기용매 분획을 각각 0.6mg/ml이 되게 조제한 후 흰쥐 체중 1KG당 1ml씩 1일 1회동안 14일간 경구 투여하여 부종 억제 여부를 조사하였다. 시료로는 의약 조성물에서 분리된 유기용매 추출물인 ABE, ABB, ABW, CBE, CBB, CBW, LNE, LNB, LNW, CRB, CRW, SSH, SSB, SSW를 각각 사용하였다. 관찰된 결과는 부종은 4일부터 유도되었으며 최고 정점에 도달하는데는 약 45일정도 경과하였으며 70일 경과할 때까지를 본 연구 기간으로 설정하여 추출물의 부종 억제효과를 관찰하였다. 측정된 결과는 정밀한 게이지를 사용하여 부종 크기를 조사하였다.

<76> 실험 예 2

<77> 류마티스 관절염의 활액막세포의 생존 유무

<78> 내원한 류마티스성 관절염환자(rheumatoid artheritis)로부터 분리된 관절 활액막 세포를 5% DMEM medium에 penicillin/ streptomycin이 함유한 배지에  $10^4$  세포를 6 well culture dish에 분주하고 37°C에서 24시간 배양하고 생존하는 세포를 관찰하였으며 세포 존재 유무 및 세포증식 상태를 관찰하기 위해 위상차 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 세포를 촬영하여 조사하였다.

<79> 실험 예 3

<80> 수정란 장뇨막에서의 활액막세포 혈관신생 유도

<81> 실험 예 2에서 분리된 세포를 대상으로 실험 예 2에서 수득된 유기용매 분획물에 대해서 활액세포의 혈관신생의 정도에 미치는 영향을 알아 보기 위해 수정란에 활액세포를 주입하고 37°C incubator에 3일간 배양하여 장뇨막(chorioallantoic membrane: CAM)의 형성을 관찰하였으며 이 상태에서 상기 방법에 의해 분리된 조성물을 각각  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 CAM위에 분주하여 CAM의 감소정도를 관찰하였다.

<82> 실험 예 4

<83> 관절염 조직의 연골조직 파괴 정도

<84> 실험 예 1에서 의약 조성물인 물추출물을 경구투여하여 관절부위에 존재하는 연골의 마모상태 내지 metalloprotease의 분비로 인한 연골조직 및 연골세포의 파괴정도를 확인하기 위해 hematoxylin/eosin 염색을 통해 위상차 현미경 200 배율로 관찰한 후 사진 촬영을 하였다.

<85> 실험 예 5

<86> 리피드폴리사카라이드로 자극한 마이크로파아지 세포내의 NO형성도

<87> 본 발명의 방법에 따라 수득된 추출물에 대하여 상기한 바와 같이 부종을 인한 혈액내의 강력한 염증 유발원인 나이트리옥사이드(nitric oxide:NO)의 합성억제를 확인하기 위해 마이크로파아지(macrophage)인 RAW264.7를 96 microplate에 각 well마다  $10^3$  세포수가 되게 분주한 다음 12시간 배양하여 리피드폴리사카라이드(lipidpolysachrride: LPS)를 50 ng/well이 되게 각 well에 분주하고 2시간 동안 자극을 가한 다음 유기용매 및 각 분획물을 최종농도가  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가한 다음 Greiss reagent 용액  $50\mu\text{l}$ 을 첨가하고 실온에서 반응을 시킨 다음 엘라이저(enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader의 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액인 0.1, 1, 10, 20, 50, 100,  $150\mu\text{M}$  sodium nitrite를 sodium nitroprusside dihydrate(SNP)으로 발색반응을 실시하여 비교분석하였다.

<88> 실험예 6

<89> 마크로파아지세포와 활액막 세포주의 세포사 유도

<90> 본 발명에 따라 분리된 의약 조성물의 활성 성분으로 확인된 상기의 화합물이 염증반응에 관여하는 macrophage인 raw 264.7세포와 활액막 세포의 세포사를 유도하는지 조사하기 위해 세포를 5% DMEM medium에 penicillin/streptomycin이 함유한 배지상에  $10^4$  세포를 6 well culture dish에 분주하고 37°C에서 24시간 배양하는데 상기 추출물을  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 첨가하여 반응을 관찰하였다. 세포사 관찰은 편광 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 세포를 촬영하여 조사하였다.

<91> 실험 예 7

<92> 마크로파아지세포와 활액막 세포주의 세포주기에 미치는 영향

<93> 실험 예 6에서처럼 2종의 세포를 배양한 다음 피비에스(phosphate-buffered saline:PBS)로 세척하여 LPS를 50 ng/ml이 되게 각 dish에 분주하고 2시간동안 자극을 가한 다음 추출물 최종농도가 20 $\mu$ g/ml이 되도록 2시간동안 가한 다음 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후 이를 trypsin을 처리하고 세포를 모아서 1.5ml eppendorf tube에 넣은 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 100% EtOH를 1ml 첨가하여 고정한다. 이때 propidium iodide 5 $\mu$ g/ml와 RNase 을 혼합해서 준비하고 상기 고정된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 PBS로 한번 세척한다. 동시에 상기 고정된 DNA에 염색시약을 첨가하여 37°C에서 30분간 항온조에서 가온시킨 다음 propidium iodide로 염색한 세포는 호일에 밀봉하여 4°C에 보관하고 유세포 검색분석기(Flow cytometry analysis)를 실시하였는데 분석기기는 FACscan ( Becton Dickinson, CA)이다.

<94> 실험 예 8

<95> RT-PCR을 통해 COX-II와 iNOS 단백질의 전사수준에서 발현억제

<96> 상기 실험 예6에서처럼 본 발명의 의약 조성물에서 유효성분으로 사용되는 추출물에 류마티스 관절염의 원인인 COX-II와 유도성 NO합성효소(inducible nitric oxide synthetase: iNOS)의 저해활성 성분을 규명하기 위하여 세포를 T75 flask에  $10^5$  세포수가 되게 분주한 다음 7일간 배양하고 LPS를 50 ng/ml이 되게 각 flask에 분주하고 2시간동안 자극을 가한다음 추출물 최종농도가 50 $\mu$ g/ml이 되도

록 가한 다음 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 RNazol 용액을 200 $\mu$ l를 첨가한 다음 chloroform 50  $\mu$ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4 °C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4°C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH<sub>2</sub>O를 20 $\mu$ l을 넣고 60°C에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 $\mu$ l에 10 mM dNTP 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l, 10x RNA PCR buffer 5 $\mu$ l, RNase inhibitor 1 $\mu$ l, AMV-Optimized Taq 1 $\mu$ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 $\mu$ l, 50 pM specific primer (sense/ antisense) 1 $\mu$ l, RNase free dH<sub>2</sub>O 26 $\mu$ l을 첨가하여 50°C에서 20분간 역전사 반응을 실시하고, 94°C에서 2분간 반응을 정지시켜서 DNA합성반응 (polymerase chain reaction: PCR)를 실시하였는데 반응조건은 94°C 1min, 55°C 45sec, 70°C 60sec에서 35 cycles를 진행시켜 70°C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 elute시켜 사이즈 마커를 기준으로 395 bp와 278 bp 부근의 band유무를 확인하였다.

<97> 실험 예 9

<98> SDS-PAGE에 의한 COX-II의 단백질 발현 확인

<99> COX-2의 활성을 저해하는지를 규명하기 위하여 본 발명의 방법에 따라 수득된 상기 기재된 추출물에 대하여 만성 류마티스 관절염 환자에서 분리된 synovial cell(활액막세포)를 T75 flask에 10<sup>5</sup> 세포수가 되게 분주한 다음 7일간 배양하고 LPS를 50 ng/ml이 되게 각 flask에 분주하고 2시간동안 자극을 가한 다음 추출 물 최종농도가 50 $\mu$ g/ml이 되도록 가한 다음 세포를 lysis buffer(0.1M SDS,

sodium azide, PMSF, pepstatin, leupstatin, pH8.0) 0.5ml으로 녹여 1.5ml eppendorf tube에 모아서 100℃ 끓은 물에 열을 가해 불활성시킨 다음 5분간 실온에서 식힌 다음 10% polyacrylamide gel(SDS-PAGE)에서 전기영동한 다음 염색하여 destaining 용액에서 탈색시켜 관찰한다.

<100> 실험예 10

<101> 면역세포화학분석법에 의한 COX-II 단백질 발현확인

<102> 본 발명에 따라 분리된 의약 조성물의 활성 성분으로 확인된 상기의 화합물이 관절내 활액막세포의 COX-II를 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 세포를 5% DMEM medium에 penicillin/streptomycin이 함유한 배지상에  $10^4$  세포를 등근 유리판(slimb cover glass)가 들어 있는 6 well culture dish에 분주하고 37℃에서 24시간 배양하는데 상기 추출물을  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 첨가하여 반응을 관찰하였으며 폐액을 제거 한 후 세포를 한번 PBS로 세척한 다음 세포를 metanol로 세포 위에 떨어지게 고정 시킨다음 PBS로 세척을 실시하고 1차 항체인 COX-II를 표지하여 4℃에서 1시간정도 방치하고 2차 항체인 형광체(fluorescein isothiocyanate:FITC)를 표지하여 호일로 빛을 차광하여 이를 1시간정도 방치한 다음 이를 형광현미경에서 관찰한다.

<103> 실험예 11

<104> X-RAY로 부종억제 흰쥐의 관절부위 분해유무

<105> 상기 실험 예 1에서처럼 물추출물 및 유기용매 분획을 각각  $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 14일간 경구 투여하여 부종 억제 여부를 조사하였다. 촬영시 부종유도 흰쥐를 마취시켜 X-RAY사진 촬영하였다.

<106> 실험 예 12

<107> CT촬영으로 ruptured disc 치료전/후 효과

<108> 상기 실시예 2에서처럼 분리 정제된 의약 조성물을 통해 임상적인 약리 효과를 조사하기 위해 물추출물을 1일 복용량  $500\text{ mg}$ 이 되게 ruptured disc 환자를 대상으로 디스크가 용출되어 나온 실례를 통해 2개월간 복용한 다음 치료전후 CT 촬영을 실시하여 보았다.

<109> 실험 예 13

<110> MRI 촬영으로 ruptured disc 치료전/후 효과

<111> 상기 실시예 2에서처럼 분리 정제된 의약 조성물을 통해 임상적인 약리 효과를 조사하기 위해 디스크가 용출되어 나온 실례의 환자를 대상으로 2개월간 복용한 다음 치료전후 MRI 촬영을 실시하여 보았다.

<112> 실험 예 14

<113> 척추 신경마비 차단에 대한 치료효과

<114> 상기의 실시예 2에서 분리된 화합물이 골질환으로 nogo-A에 의해서 신경마비 현상이 유도되어 그로 인한 신경마비 현상에 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 한국세포주 은행에서 분양받은 brain에서 기원한 글리아 아세포종 (glioblastoma세포: U-373 MG)를 10% DMEM medium에 penicillin /streptomycin이

함유한 배지상에  $10^4$  세포를 6 well culture dish에 분주하고 37°C에서 24시간 배양하고 nogo-A가 잘 발현되는 vector를 stable transfection를 실시하여 신경의 neurite가 감소 내지 신장억제되는지를 확인하여 관찰하였으며 동시에 neuronal growth factor(NGF)를 처리시 재생되는지 혹은 상기 분획물을 처리시 동일한 현상이 유도되는지를 확인하여 위상차 현미경의 200배율에서 사진 촬영하여 관찰하였다.

## &lt;115&gt; 실험 예 15

<116> 실험 예 2에서처럼 배양한 용기에서 관찰한 결과 1일 배양한 퇴행성 관절염인 환자 경우 세포가 자라지 않았으며 육안상 부착세포가 존재하지 않고 혼탁상태로 부유하고 있었으며 만성 관절염환자에서 분리된 경우는 세포가 자라고 7일 경과 후 증식이 이루어지고 있음을 위상차 현미경의 200배율에서 세포를 관찰할 수 있었다. 따라서 퇴행성 관절염 환자는 활액막 전체가 연골조직을 둘러싸고 있지 않고 마모되어 활액막 세포의 부재를 통해 연골조직이 파괴를 더욱 촉진하는 것을 알 수 있었으며 반대로 만성 관절염 경우 활액막 세포가 염증이나 자가면역으로 인한 세포증식이 병적으로 진행되어진다(도 3).

## &lt;117&gt; 실험 예 16

<118> 상기 분리된 각각 분획을 부종 유도 실험에 적용시 LNE-1, 3에서 강하게 부종 억제효과를 나타 내었는데 특히 LNE-3가 유의성이 가장 강하였다. 아래와 같이 70일 경과한 상태에서 본 화합물의 효과에대한 부종 억제효과에 대하여 관찰 되어진 결과는 표 2, 3 와 도 4에 기재하였다.

&lt;119&gt; 표 2. 유기 용매 추출별 부종 유도 억제정도(단위: mm)

<120>	샘 플	약물처리 전	약물처리 후	샘 플	약물처리 전	약물처리 후
	ABE	15.5±2	8.5±2	LNB	15.6±1	5±1
	ABB	14.6±3	10.1±1	LNW	14.5±2	8±1
	ABW	14.4±1	12.2±2	CRB	15.5±1	9±2
	CBE	16.3±2	4.1±1	CRW	15.6±1	9±1
	CBB	14.6±1	3.6±1	SSH	14.5±2	12±2
	CBW	15.5±2	7.2±2	SSB	13.3±1	13±1
	LNE	14.5±3	5.3±1	SSW	14.4±2	13±1

&lt;121&gt; 표 3. 부종 억제효과가 가장 우수한 유기용매 분획

<122>	분획 시료	약물처리 전	약물 처리 후
	CBB	14.6±2	3.6 ±
	CBB- 13	14.4±2	2.5 ±
	CBB- 20	14.5±1	3.1 ±
	CBB- 30	14.3±1	3.6 ±
	LNE	15.6±1	5.2 ±
	LNE- 1	15.1±2	5.1 ±
	LNE-3	15.2±1	3.8 ±

&lt;123&gt; 실험 예 17

<124> 상기 실험 예 3에서처럼 수득된 추출물에 대하여 활액세포의 혈관신생의 정도에 미치는 영향을 CAM의 감소정도로 관찰하였는데 그 결과로는 정상적인 수정란에서는 CAM의 형성이 다소 느리지만 synovial cell을 주입한 세포에서는 강력하게 CAM의 형성이 유도되었으며 이에 비해 LNE-3분획군에서는 대조군보다 더 강하게 유도가 억제됨을 알 수 있었다. 따라서 상기 조성물에서 synovial 세포의 증식 억제뿐만 아니라 활액막의 세포에 의한 angiogenesis(혈관신생)의 CAM 유도도

억제시키는 양상을 추측해 볼 때 상기 약물은 관절염의 치료에 우수한 효과를  
가짐을 알 수 있다(도 5).

<125> 실험 예 18

<126> 상기 실험 예 4에서처럼 관절부위에 존재하는 연골의 마모상태 내지  
metalloprotease의 분비로 인한 연골조직 및 연골세포의 파괴정도를 확인하기  
위해 hematoxylin/eosin 염색을 통해 위상차 현미경 100 배율로 관찰한 후 사진  
촬영을 실시한 결과 본 약물인 정상군경우 연골조직의 분포 양상은 균일하게 골  
조직의 분포나 거물상이 골고루 존재하나 대조군인 경우 골파괴가 많이 진행되고  
골조직이 분해된 흔적이 보인 반면 JWA 와 JWB에서는 정상군과 유사한 골조직  
형태를 보임을 알 수 있는데 이는 본 물추출물이 연골조직의 파괴 내지 연골 재  
생기능이 있음을 알았다(도 6).

<127> 실험 예 19

<128> 상기 실험 예 5에서처럼 비교 분석하여 상기 약물에 대한 수치를 상대 평가로  
유추한 결과는 막대 그래프에서 나타난 것처럼 대조군은 약  $98 \mu\text{M}$ 정도로 높은 반  
면 CBB, CBE, LNE, LNB 분획물에서 유의성 있는 NO형성 저해효과를 보임을 알  
수 있고(도 7a), 특히 LNE 분획계열과 LNE-3에서 더 강하게 저해효과를 보임을 알  
수 있었다. 이는 본 조성물들이 NO형성을 유도하는 iNOS의 합성을 억제함으로 기  
인한 결과라 사료된다(도 7b).

<129> 실험 예 20

<130> 실험 예 6에서처럼 상기의 화합물이 염증반응에 관여하는 macrophage인 raw 264.7 세포와 synovial cell의 세포사를 유도하는지 조사하였는데 그 결과 대조군 경우 세포 증식이 활발하게 진행하고 있는데 비해 약물 처리군 경우 LNE 분획계열인 LNE-1, 3에서 더 강하게 세포사를 유도하는 효과를 보임을 알 수 있었다 따라서 본 조성물이 두종의 세포에서 세포사를 유도하고 결론적으로 염증 및 부종을 억제하는데 관여한다고 사료된다(도 8a, b).

<131> 실험 예 21

<132> 상기 실험 예 7에서 본 의약 조성물인 유효성분의 분획물이 세포 주기에 미치는 영향을 관찰해 본 결과 synovial fibroblast 세포주와 macrophage인 raw 264.7 세포주를 분석한 결과 macrophage 세포주에서는 대조군 경우 전형적으로 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase가 상대적으로 제일 높은 반면 S phase는 제일 낮은 peak를 보이고 G<sub>2</sub>/M phase 경우 중간 peak를 나타내고 있다. 특히 약물 처리군에서 CBB-13 경우 apoptosis(세포사)를 LNE-3에서 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest를 유도하는 것으로 보아 상기 약물들은 세포사를 유도하는 약물인 것을 예측되어진다(도 9a). 한편 synovial cell 세포주에서는 대조군 경우 일반적으로 증식이 왕성한 세포주와 달리 세포의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase가 상대적으로 G<sub>2</sub>/M phase보다 낮고 S phase가 대체로 높은 peak를 보이고 있는데 이는 세포분열보다 핵분열이 많이 일어나거나 증식 속도가 느린 전이성 암세포나 angiogenesis가 일어나는 세포의 양상으로 본 약물인 CBB-13은 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest 양상을 나타내고 있으며. LNE-3에서 apoptosis를 유도하는 것으로 보아 상기 약물들은 synovial cell에서는 세포사를 유도하는 약물인 것을 예측되

어진다(도 9b). 따라서 본 분획물인 LNE-3 경우 세포사를 유도함으로 골질환의 원인인 세포의 증식을 억제함으로 골질환 치료에 유의성이 있음을 알 수 있다.

<133> 실험 예 22

<134> 상기 실험 예 11에서처럼 본 발명의 의약 조성물에서 유효성분이 synovial cells내 류마티스 관절염의 원인인 COX-2의 발현을 저해하는지를 10% polyacrylamide gel(SDS PAGE)에서 전기영동한 다음 염색하여 destaining 용액에 서 탈색시켜 관찰한 결과는 COX-II단백질의 분자량은 약 70KD정도이고 대조군 경우 강한 band를 보인데 반해 LNE-3 경우 약한 band를 보이는 것으로 보아 본 약물은 단백질의 발현을 억제하는 약리작용을 가짐을 알 수 있다(도 10).

<135> 실험 예 23

<136> 상기 실험 예 8에서처럼 PCR를 실시하여 전기영동을 실시한 바 iNOS 경우 PCR 산물은 278 bp 부근의 band유무를 확인하였는데 lane 1, 2, 3, 4는 각각 대조군, ABB, SSB, CRB이고 발현에 영향이 없었으며 이에 비해 lane 5, 6, 7, 8경우는 CBB, CBB-13, LNE, LNE-3으로 단백질 발현에 영향을 주고 있음을 확인할 수 있었 고 COX-II경우는 lane 1, 2, 3에서는 발현에 영향이 없는 반면 lane 4, 5, 6, 7, 8에서는 전사 수준에서 억제효과를 보였다(11 a). 실시 예15에서처럼 본 발명의 의약 조성물에서 유효성분으로 사용되는 추출물에 류마티스 관절염의 원인인 COX-2와 iNOS의 발현을 조사한 결과 iNOS 단백질경우 각 분획물의 elute lane에 해당되는 lane 1, 3, 4는 각각 대조군, ABB, CRB이고 발현에 전혀 영향이 없었으며 이에 비해 lane 2, 5, 6, 7, 8경우는 각각 CBB, LNE, SD, DS, YM이고 단백질 발현을 강하게 억제하

는 것을 알 수 있다(도 11b), COX-2경우는 또한 lane 1, 2, 3, 5에서는 각각 대조군, CBW, ABB, LNW이며 발현에 전혀 영향이 없었으며 lane4, 6, 7, 8은 각각 CBB-13, 20과 LNE-1, 3이며 COX-II의 발현을 강하게 억제하는 것을 알 수 있다 (도 11c).

<137> 실험 예 24

<138> 본 발명에 따라 분리된 의약 조성물이 관절내 활액막 세포 COX-II의 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 실험예 10에서처럼 세포를 metanol로 세포 위에 떨어지게 고정 시킨 다음 PBS로 세척을 실시하고 1차 항체인 COX-II를 표지하여 4°C에서 1시간정도 방치하고 2차 항체인 FITC를 표지하여 호일로 빛을 차광하여 이를 1시간정도 방치한 다음 이를 형광현미경에서 관찰한 결과 대조군은 정상군에 비해 COX-II의 단백질이 강하게 발현이 되고 LNE-3경우는 발현정도가 크게 감소하는 경향을 보임을 알 수 있었다. 이는 COX-II의 단백질 발현이 상기 실시예 16에서처럼 전사수준에서 전사를 억제하기 때문에 기인한 결과라 사료된다(도 12).

<139> 실험 예 25

<140> 의약 조성물이 가지는 부종 억제효과를 관찰하였는데 분리된 유기용매 추출물 LNE-1, 3를 각각 사용하여 부종을 유도한 흰쥐를 마취시켜 X-RAY로 사진촬영하였는데 관찰된 결과는 대조군경우 류마티스 관절염의 연골부위가 심하게 파괴되고 골조직의 분해정도가 강하게 손상을 입었으며 약 70일 경과까지 손상 정도가 최고 정점에 도달하였다. 한편 대조군과 달리 LNE-3에서 관절염 부위의 연골이

파괴되는 것을 억제하고 골 합성을 촉진하는 효과를 가짐을 알 수 있었다(도 13).

<141> 실험 예 26

<142> 상기 실험 예 12에서처럼 임상적인 약리효과를 조사하기 위해 본 발명의 방법에 따라 수득된 물추출물에 대하여 디스크 환자를 대상으로 디스크가 용출되어 나온 실례를 통해 2개월간 복용한 다음 치료전후로 CT 촬영을 실시하여 보았는데 치료전 대조군에서는 ruptured disc가 파열되어 나오는데 비해 치료후에는 disc 가 소실되고 신경염이 소멸되고 그로 인한 신경마비가 제거되었다(도 14).

<143> 실험 예 27

<144> 실험 예 1에서 수득된 물추출물에 대하여 디스크 환자를 MRI 촬영을 실시하여 보았는데 치료전 대조군에서는 ruptured disc가 파열되어 나오는데 비해 치료후에는 disc가 소실되고 그로 인한 신경마비가 제거되었다(도 15).

<145> 실험 예 28

<146> 상기 실험 예 16에서처럼 신경의 neurite가 감소 내지 억제되는지를 확인하여 관찰하였으며 동시에 neuronal growth factor(NGF)를 처리시 neurite가 재생되거나 혹은 상기 분획물을 처리시 동일한 현상이 유도되는지를 확인하여 편광 현미경의 200배율에서 사진 촬영하여 관찰하였는데 nogo-A가 발현된 U-373세포주에서 는 원래의 길게 뻗어 나온 neurite가 줄어들거나 거의 소실되는 양상을 보이며( 도18 a), NGF, CBB-13 및 LNE-3를 각각 처리시 세포에서 neurite가 길어지는 양

상을 볼 수 있었다. 이로써 본 약물에 의하여 NGF와 비교시 신경이 재생하도록 neurite의 재생을 촉진하는 것임을 알 수 있었다(도 18 b).

<147> 실험 예 29

<148> 본 발명에 따라 분리된 의약 조성물의 활성 성분으로 확인된 상기의 화합물은 골질환에서 각각 효과를 보이는 화합물을 화학적 구조결정을 통해 확인을 실시한 결과 LNE-1, 3은 각각 하르파고시드, 하르파지드로 이미 화학적 동정이 알려진 구조이나 약리효과가 아직 미확인된 상태에서 효능에 대한 결과를 처음 밝혀지게 되었다.

<149> 이상의 실험결과로부터 확인되는 바와 같이, 본 발명의 하르파지드 및 하르파고시드는 유효한 골다공증, 관절염 및 파열된 디스크에 효능을 가지고 있다.

<150> 따라서, 본 발명의 화합물은 의약품으로서 유용하게 사용될 수 있다.

<151> 본 발명의 화합물은 환자의 성별, 나이, 질병의 정도 등에 의하여 그 사용량이 달라질 수 있으나, 일일 0.1mg 내지 500mg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

<152> 본 발명의 화합물은 골다공증 또는 관절염의 예방 및 치료 효능을 가지는 기준에 이미 약제로 사용되고 있는 알렌드레이트(allendrate), 타목시펜(tamoxifen), 비타민 B<sub>3</sub>, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone: PTH), 설파살라진(sulfasalazine), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase), 알렌드로네이트(alendronate), 랄록시펜(raloxifene), 칼시토닌(calcitonin), 에스타라디

올 (estradiol), 게니스테인(genistein), 1,25-디하이드록시바이타민 D<sub>3</sub>, 알렌드로네이트(alendronate), 에스트로겐 수용체 조절제(estrogen receptor modulator), 비포스포네이트(biphosphonates), 하르파지드(harpagide: 본 발명자가 그 용도를 개발한 약물임) 등과 같은 약물과 병용하여 사용될 수도 있다.

<153> 본 발명의 화합물과 상기의 약물을 병용하면, 기존 약물의 상용량을 줄일 수 있고, 따라서 기존 약물들이 가지는 문제점들을 경감시킬 수 있다.

<154> 본 발명의 화합물은 약제학적으로 통상으로 사용되는 부형제, 보조제, 무통화제, 등장화제, 보존제, 및 기타 약제학적으로 통상으로 허용되는 보조제와 혼합하고 약제학적으로 통상으로 허용되는 제제형태로 제제화하여 약학적 제제를 제조할 수 있다. 이러한 약제학적 제제형태로는 주사제, 액제, 정제, 캡슐제, 산제, 시럽제 등으로 제제화 할 수 있다.

<155> 다음에 제제 실시예로서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<156> 제제실시예 1

<157> 하르파지드 5mg

<158> 주사용 멸균증류수 적량

<159> pH조절제 적량

<160> 하르파지드를 주사용 증류수에 용해하고 pH 조절제로 pH약 7.6로 조절한 다음 전체를 2ml로 한후 2ml용량의 앰플에 충진하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

<161> 제제실시예 2

<162> 하르파지드 10mg

<163> 주사용 멸균 종류수 적량

<164> pH 조절제 적량

<165> 하르파고시드를 주사용 멸균종류수에 용해하고 pH조절제로 pH약 7.2로 조절하고 전체를 2ml로 한 다음 2ml용량의 앰플에 충진하여 주사제를 제조한다.

<166> 제제실시예 3

<167> 하르파지드 20mg

<168> 유당 100mg

<169> 전분 100mg

<170> 스테아린산 마그네슘 적량

<171> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<172> 제제실시예 4

<173> 하르파지드 10mg

<174> 하르파고시드 10mg

<175> 유당 100mg

<176> 전분 50mg

<177> 스테아린산 마그네슘 적량

<178> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

.1020000071497

출력 일자: 2001/11/5

<179> 제제실시예 5

<180> 하르파지드 15mg

<181> 유당 50mg

<182> 전분 50mg

<183> 탈크 2mg

<184> 스테아린산마그네슘 적량

<185> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에  
충진하여 캡슐제를 제조한다.

<186> 제제실시예 6

<187> 하르파고시드 25mg

<188> 유당 100mg

<189> 전분 93mg

<190> 탈클 2mg

<191> 스테아린산 마그네슘 적량

<192> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에  
충진하여 캡슐제를 제조한다.

<193> 제제실시예 7

<194> 하르파고시드 500mg

<195> 설탕 20g

<196> 이성화당 20g

<197> 레몬향 적량

<198> 정제수를 가하여 전체 100ml

<199> 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100ml 의 갈색병에  
충진하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

<200> 제제실시 예 8

<201> 하르파지드 100mg

<202> 신바로메틴 100mg

<203> 설탕 20g

<204> 이성화당 20g

<205> 레몬향 적량

<206> 정제수를 가하여 전체 100ml

<207> 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100ml 의 갈색병에  
충진하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

<208> 제제실시 예 9

<209> 하르파지드 5mg

<210> 알렌드레이트 10mg

<211> 주사용 멸균증류수 적량

<212> pH조절제 적량

<213> 하르파지드 및 알렌드레이트를 주사용 증류수에 용해하고 pH 조절제로 pH약 7.6로 조절한 다음 전체를 2ml로 한 후 2ml용량의 앰플에 충진하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

<214> 제제 실시예 10

<215> 하르파지드 5mg

<216> 타목시펜 10mg

<217> 주사용 멸균증류수 적량

<218> pH조절제 적량

<219> 하르파지드 및 타목시펜을 주사용 멸균증류수에 용해하고 pH조절제로 pH약 7.2로 조절하고 전체를 2ml로 한 다음 2ml용량의 앰플에 충진하여 주사제를 제조한다.

<220> 제제실시예 11

<221> 하르파고시드 20mg

<222> 설파살라진 20mg

<223> 유당 100mg

<224> 전분 100mg

<225> 스테아린산 마그네슘 적량

<226> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<227> 제제실시예 12

- <228> 하르파고시드 10mg
- <229> 알렌드로네이트 50mg
- <230> 유당 100mg
- <231> 전분 50mg
- <232> 스테아린산 마그네슘 적량
- <233> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- <234> 제제실시 예 13
- <235> 하르파지드 10mg
- <236> 신바로메틴 10mg
- <237> 유당 50mg
- <238> 전분 50mg
- <239> 탈크 2mg
- <240> 스테아린산마그네슘 적량
- <241> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조한다.
- <242> 제제실시 예 14
- <243> 하르파지드 5mg
- <244> 랄록시펜 10mg
- <245> 유당 50mg

- <246> 전분 50mg
- <247> 탈크 2mg
- <248> 스테아린산마그네슘 적량
- <249> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조한다.
- <250> 제제실시 예 14
- <251> 하르파지드 5mg
- <252> 파미드론산 디소디움 20mg
- <253> 유당 100mg
- <254> 전분 93mg
- <255> 탈클 2mg
- <256> 스테아린산 마그네슘 적량
- <257> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조한다.
- <258> 제제실시 예 16
- <259> 하르파지드 1000mg
- <260> 파미드로네이트 디소디움 1000mg
- <261> 설탕 20g
- <262> 이성화당 20g
- <263> 래몬향 적량

<264> 정제수를 가하여 전체 100ml

<265> 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100ml 의 갈색병에  
충진하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

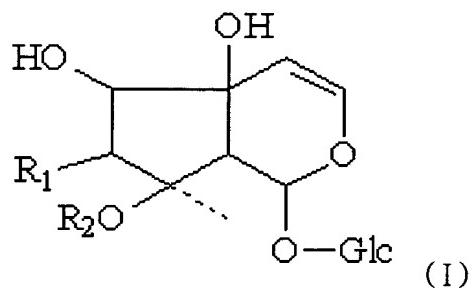
### 【발명의 효과】

<266> 본 발명에 따른 상기 일반구조식 (I)의 화합물은 골다공증, 관절염 및 디스크 치료에 탁월한 효능을 가지는 것으로 확인되었으며, 따라서 이 화합물을 유효성 분으로 함유하는 약학적 제제는 골다공증, 관절염 및 디스크질환의 예방과 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

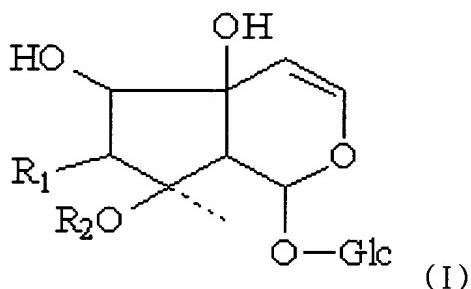
다음 일반구조식 (I)을 가지는 화합물의 골다공증, 관절염 및 디스크질환에 대한 예방과 치료제로서의 용도.



상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일이다.

【청구항 2】

다음 일반구조식 (I)을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 통상으로 사용되는 보조제, 희석제, 등장화제, 보존제, 활탁제, 용해보조제와 함께 약제학적으로 통상으로 허용되는 방법으로 약제학적으로 통상으로 허용되는 제제형태로 제제화한 골다공증, 관절염 및 파열된 디스크에 탁월한 효능을 가지는 약학적 제제.

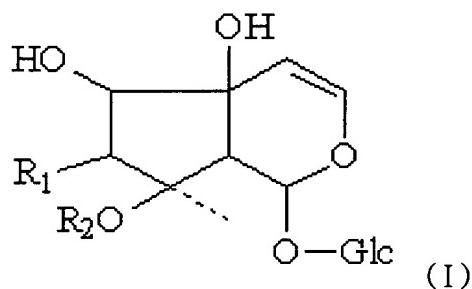


상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일이다.

### 【청구항 3】

다음 일반구조식 (I)의 화합물을 유효성분으로 하고 골다공증, 관절염치료제로서의 효능을 가지는 기존에 이미 약제로 사용되고 있는 알렌드레이트(allendrate), 타목시펜(tamoxifen), 비타민 B<sub>3</sub>, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone: PTH), 살파살라진 (sulfasalazine), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase), 알렌드로네이트 (alendronate), 랄록시펜(raloxifene), 칼시토닌(calcitonin), 에스타라디올 (estradiol), 게니스테인(genistein), 1,25-디하이드록시바이타민 D<sub>3</sub>, 알렌드로네이트(alendronate), 에스트로겐 수용체 조절제(estrogen receptor modulator), 비포스포네이트(biphosphonates), 신바로메틴(본 발명자들이 개발한 신물질) 및 신바로메틴 아세테이트(본 발명자들이 개발한 신물질)에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 통상으로 허용되는 부형제, 보조제, 희석제, 등장화제, 보존제, 활탁제, 용해보조제와 함께 약제학적으로 통상으로 허용되는 방법으로

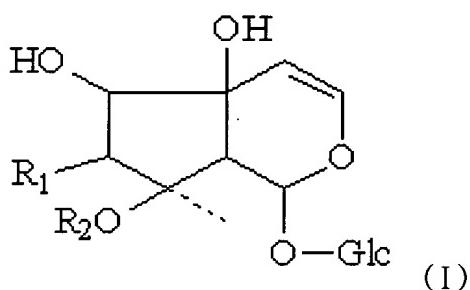
약제학적으로 통상으로 허용되는 제제형태로 제제화한 골다공증, 관절염 및 파열된 디스크에 탁월한 효능을 가지는 약학적 제제.



상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일이다.

#### 【청구항 4】

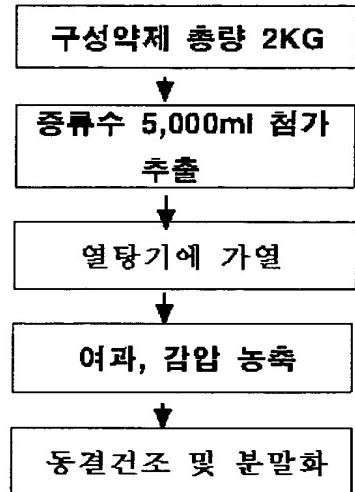
다음 일반구조식 (I)의 화합물에서  $R_2$ 가 신나모일인 화합물을 가수분해해서 약리학적 효과가 높은  $R_2$ 가 수소원자인 화합물을 제조하는 방법.



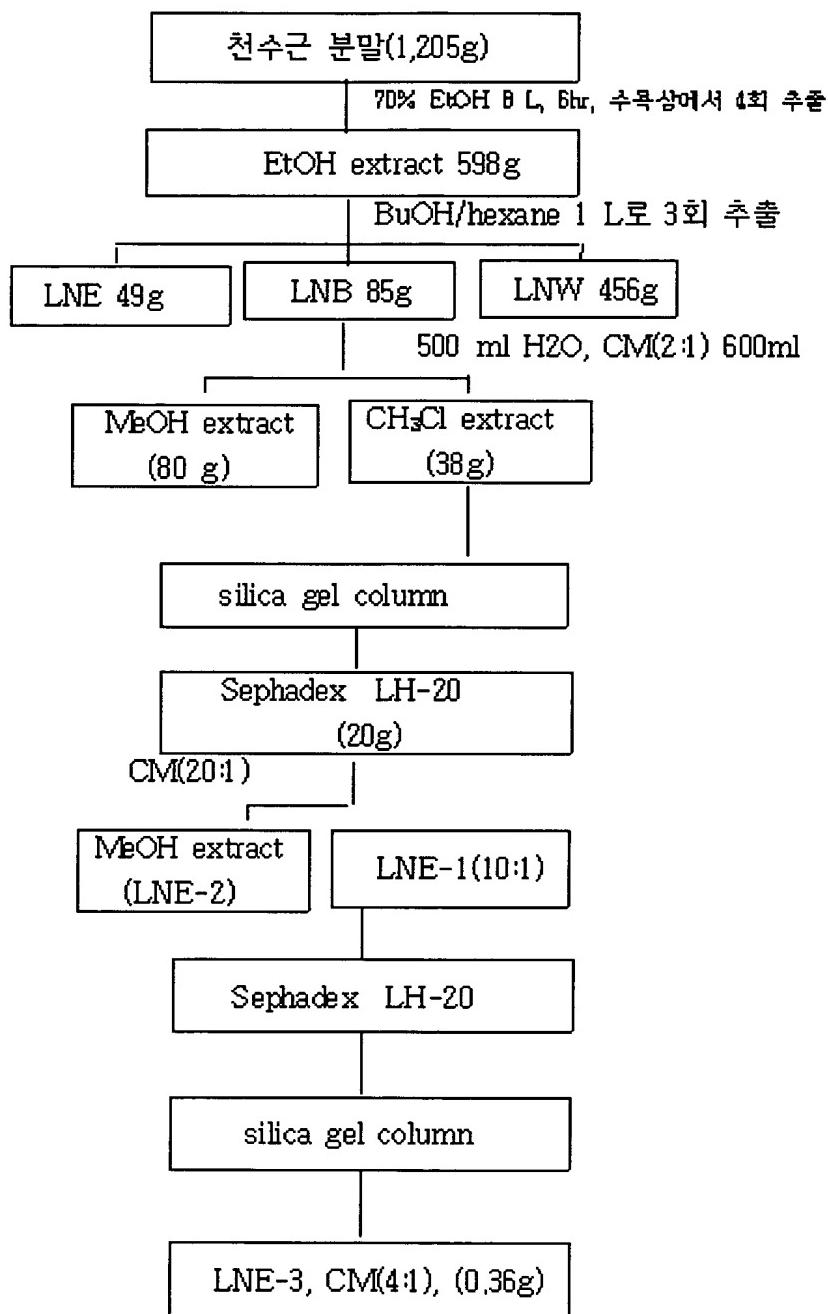
상기식에서  $R_1$ 은 수소원자 또는 저급알킬이고,  $R_2$ 는 수소원자 또는 신나모일이다.

【도면】

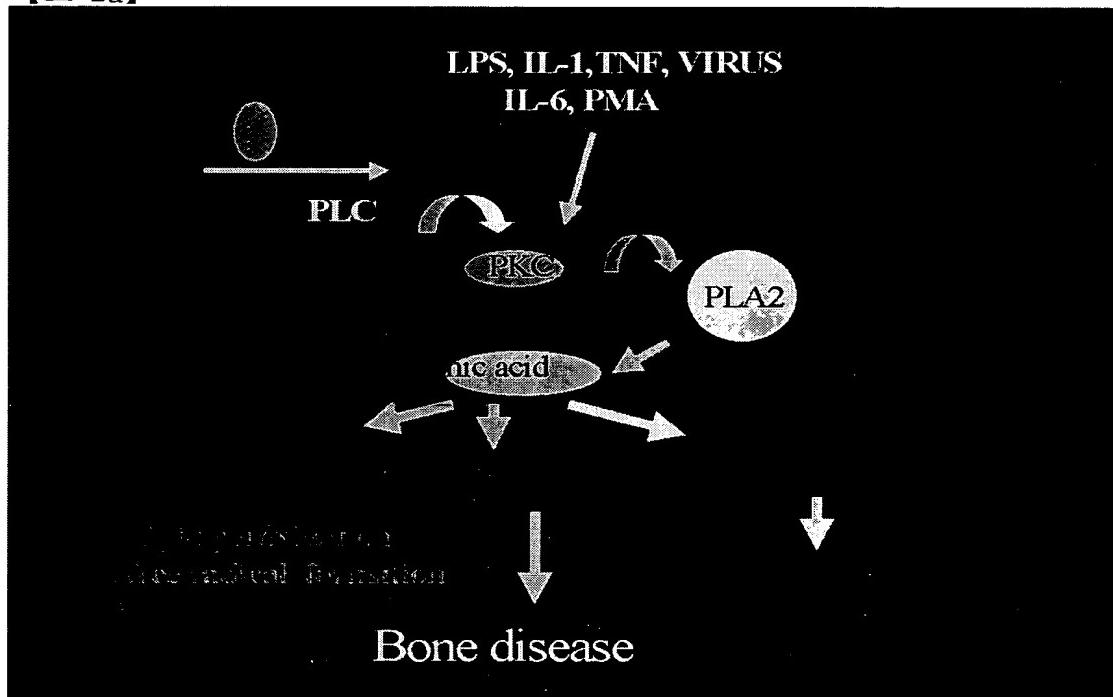
【도 1a】



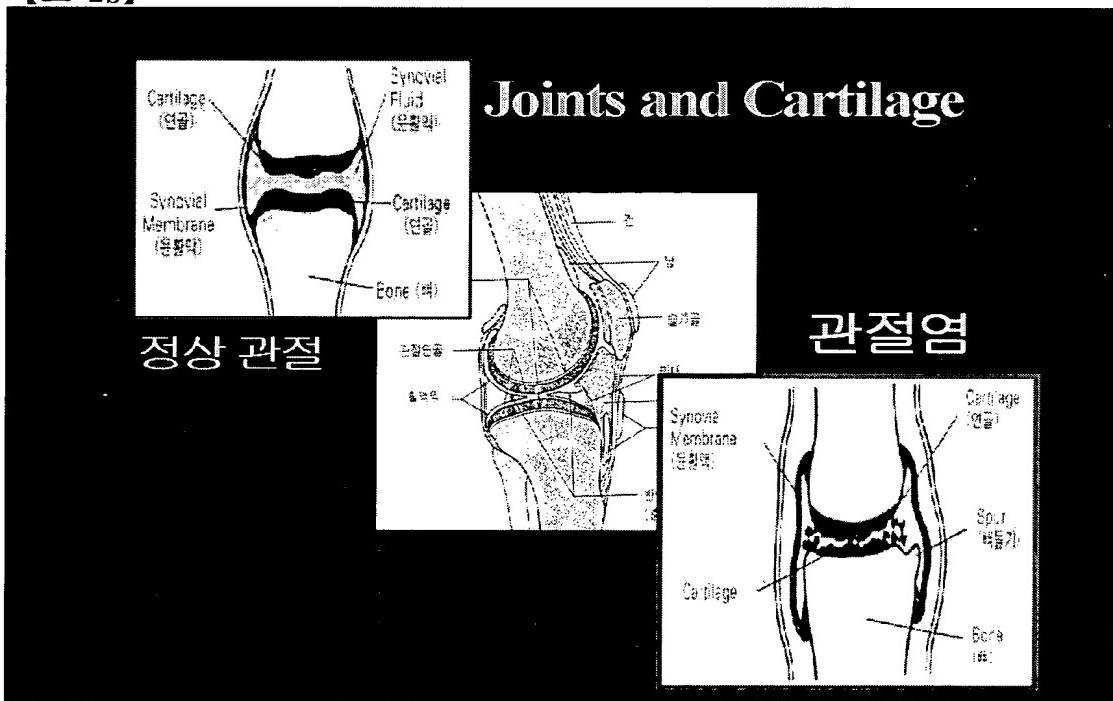
## 【도 1b】



### 【도 2a】



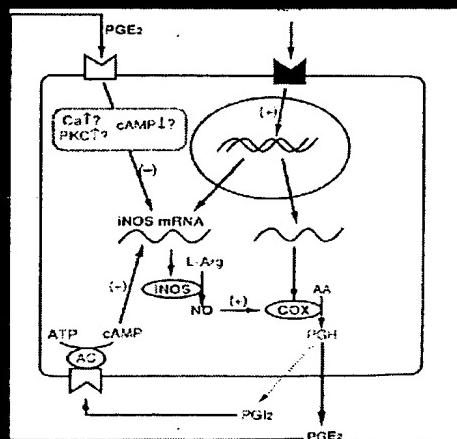
### 【도 2b】



【도 2c】

**Signalling of iNOS and COX-2 expression  
in synovial fibroblast cell**

LPS/IL-1

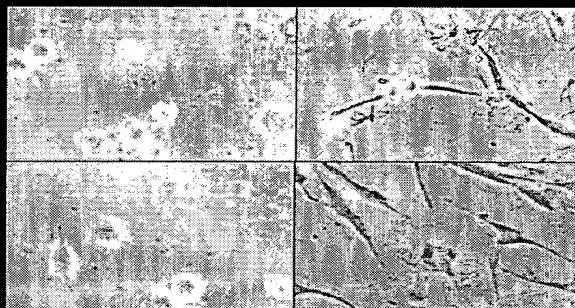


【도 3】

**류마티스 환자 내 synovial cell 분리배양**

**퇴행성 만성**

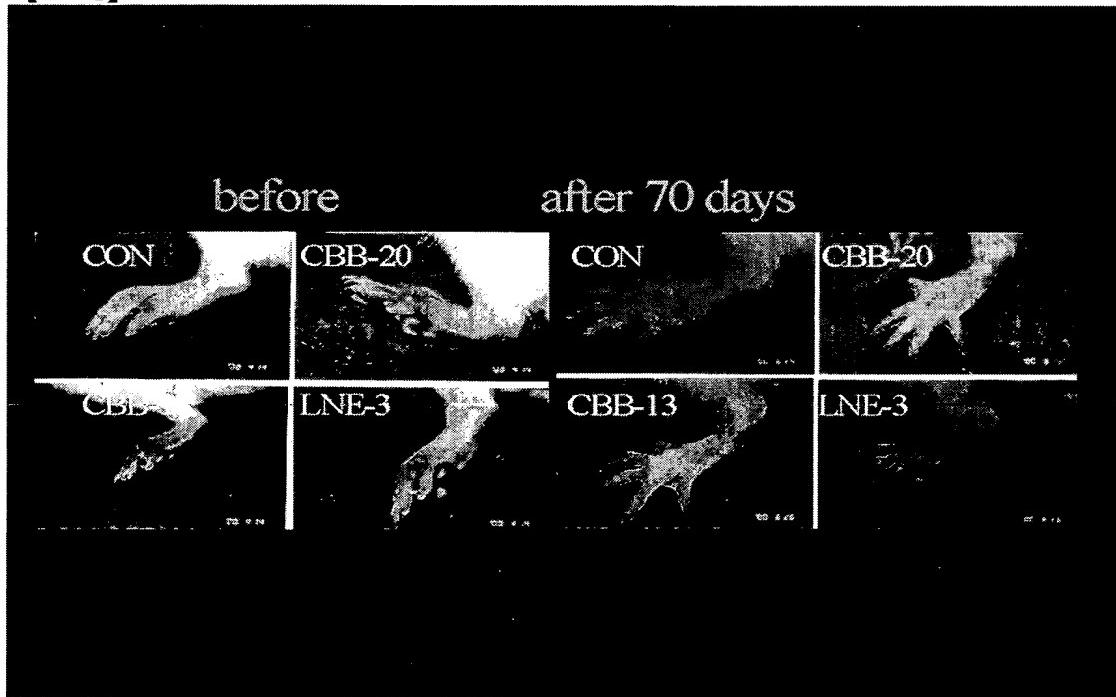
1day



7 day

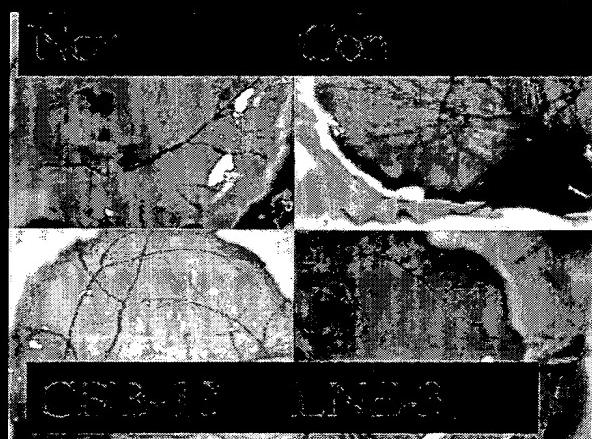


【도 4】



【도 5】

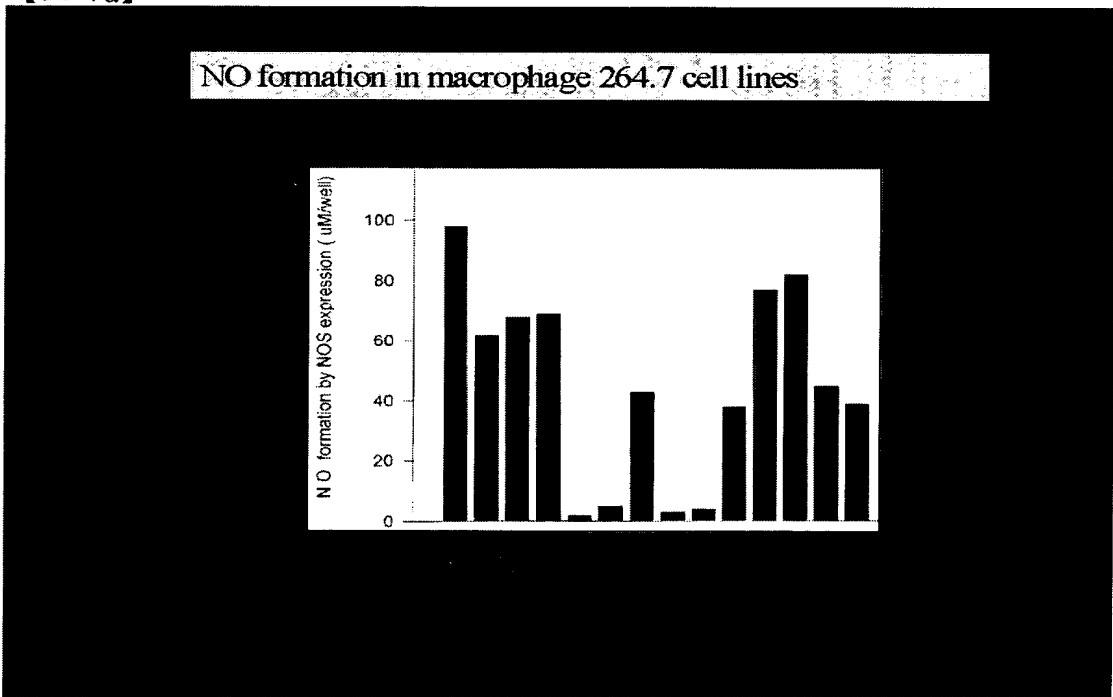
Angiogenic inhibitory effect in CAM  
by CBB-13/ LNE-3



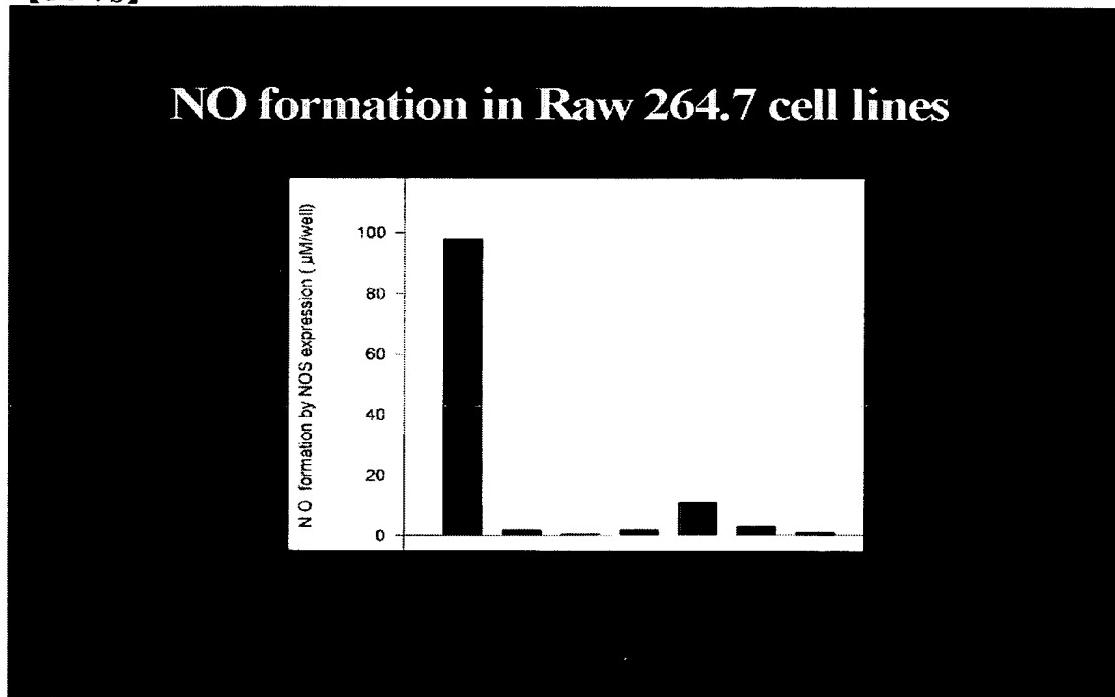
【도 6】



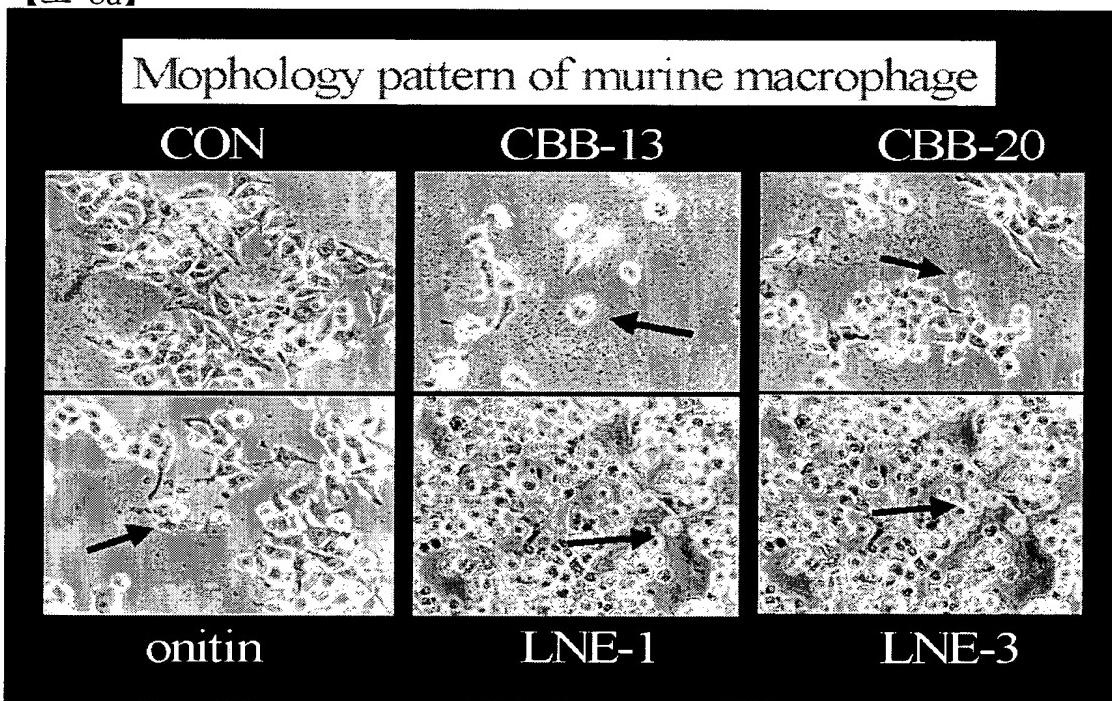
【도 7a】



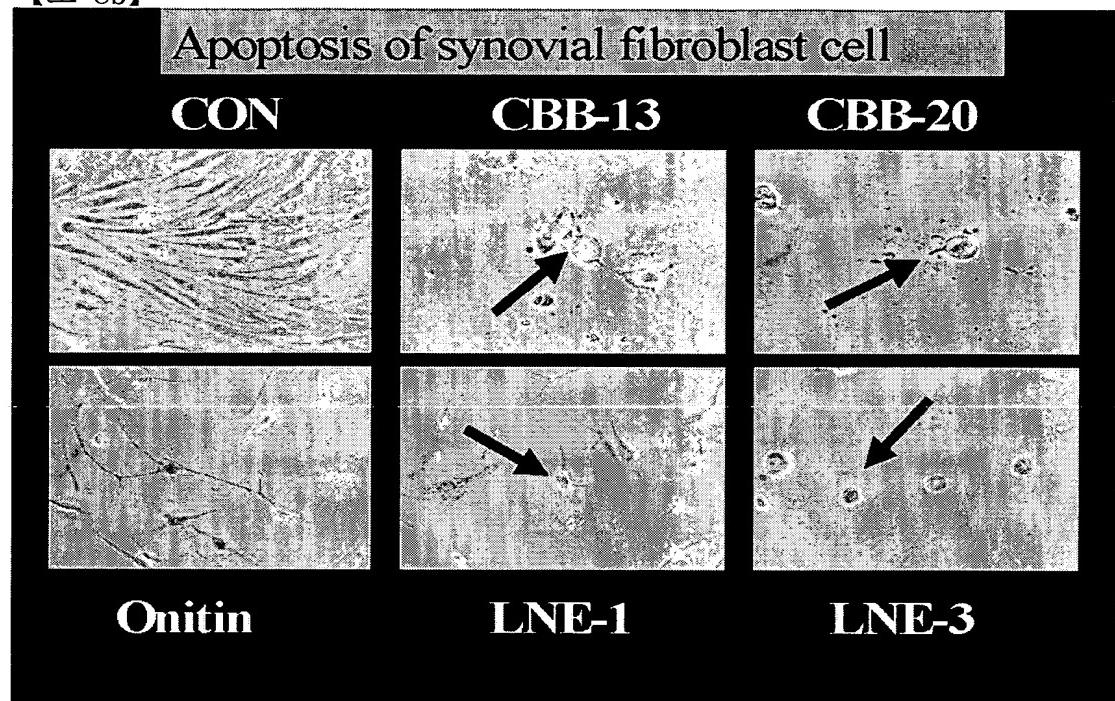
【도 7b】



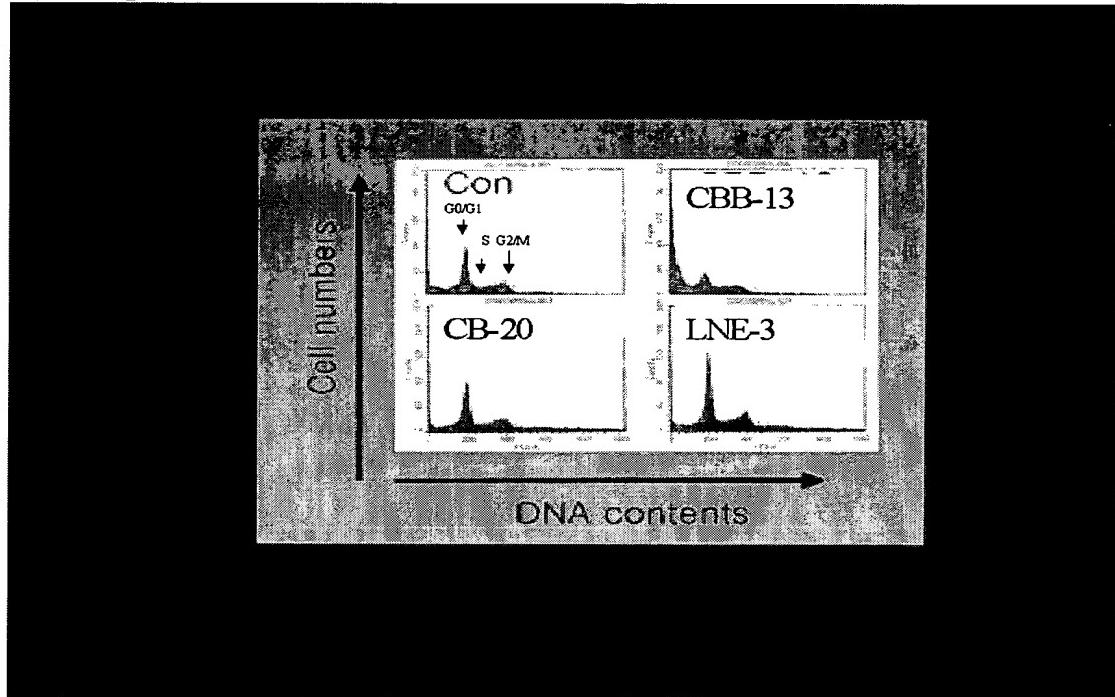
【도 8a】



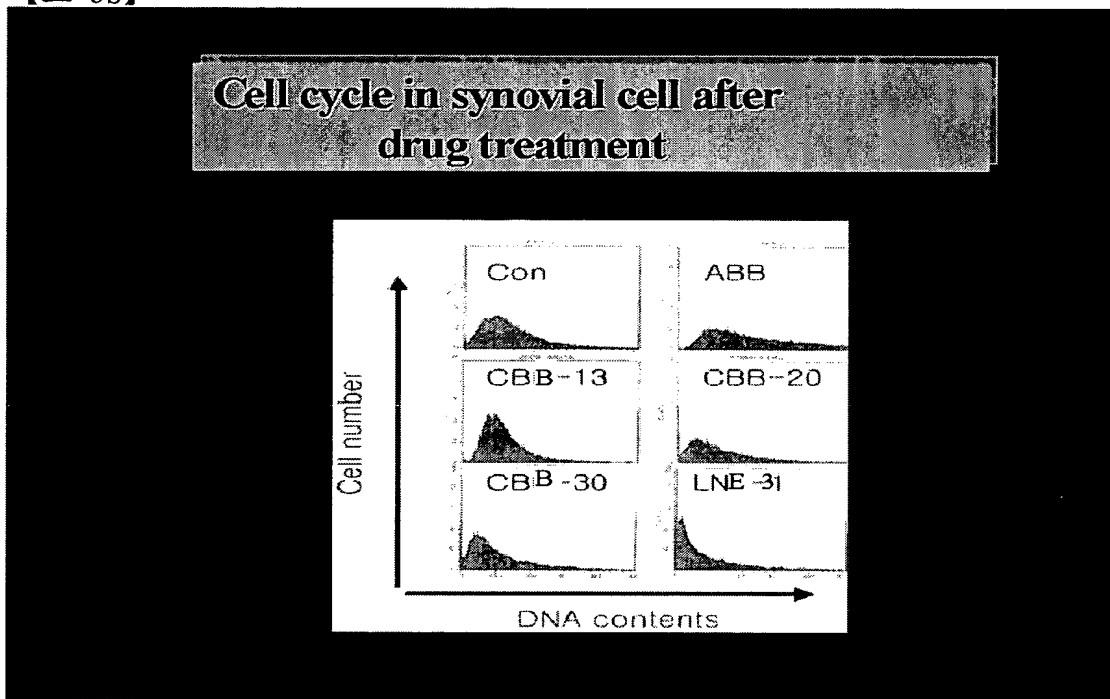
【도 8b】



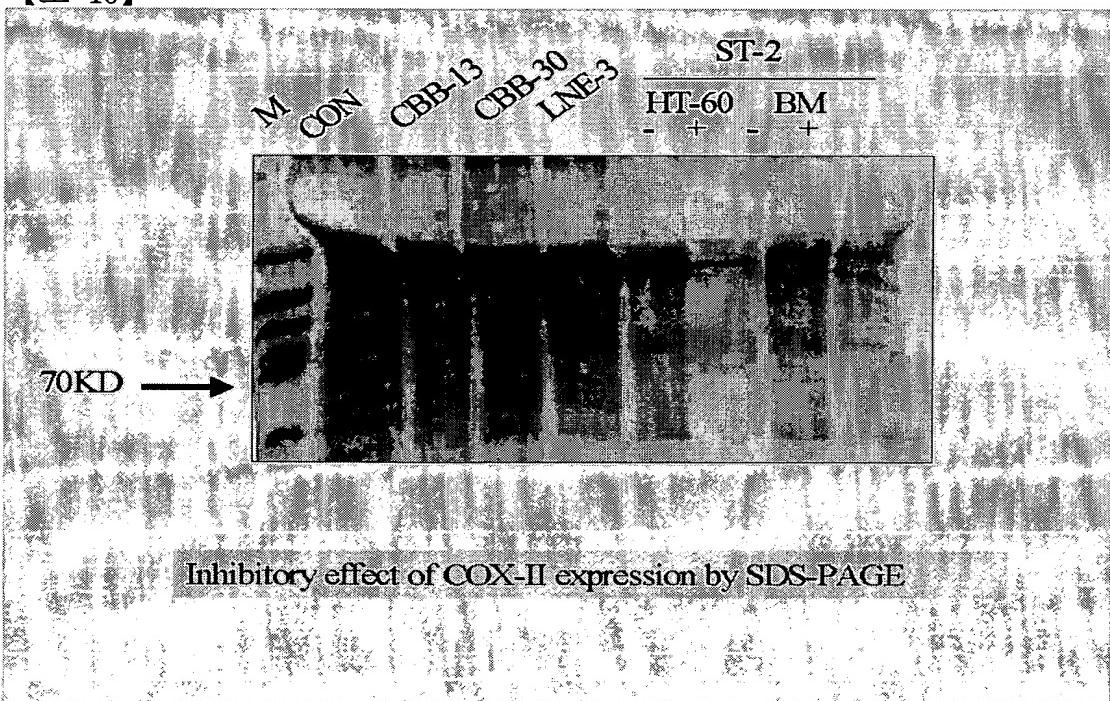
【도 9a】



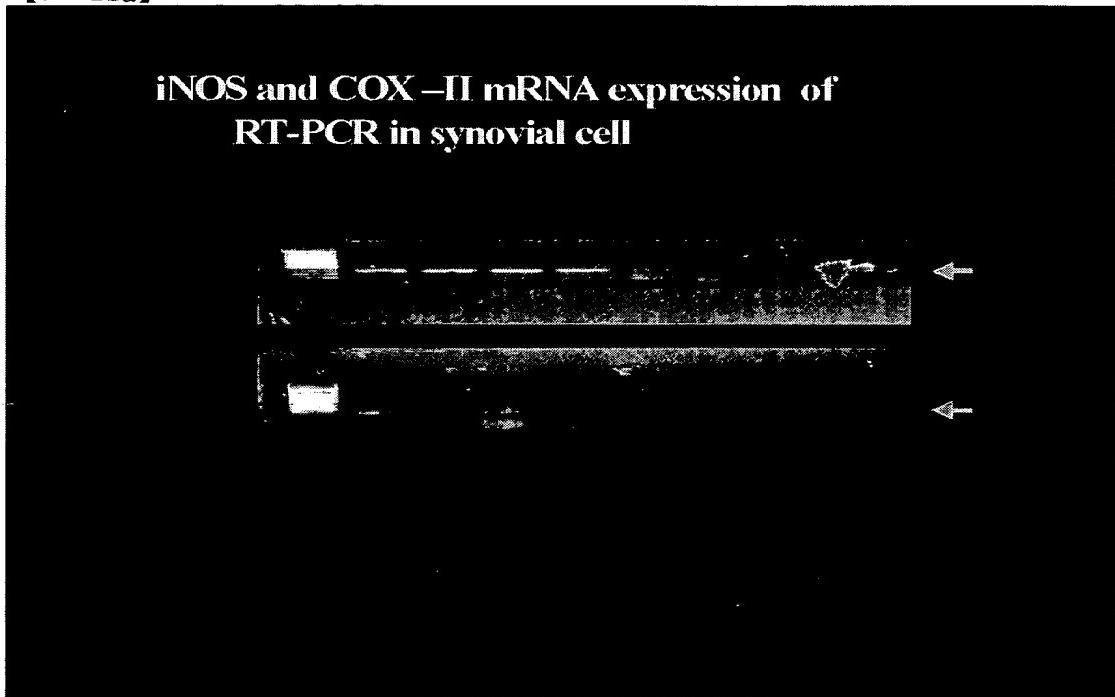
【도 9b】



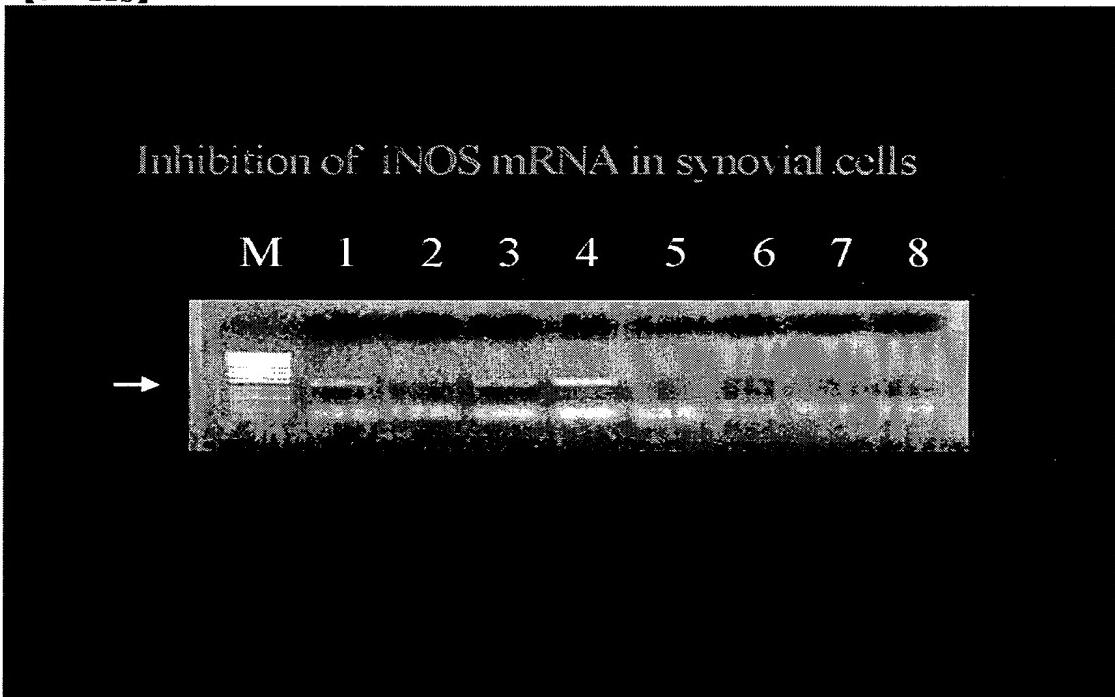
【도 10】



【도 11a】

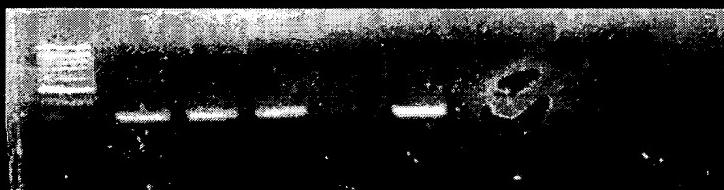


【도 11b】



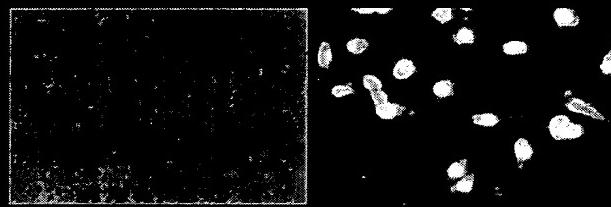
【도 11c】

## Cox 2 mRNA inhibition of synovial fibroblast

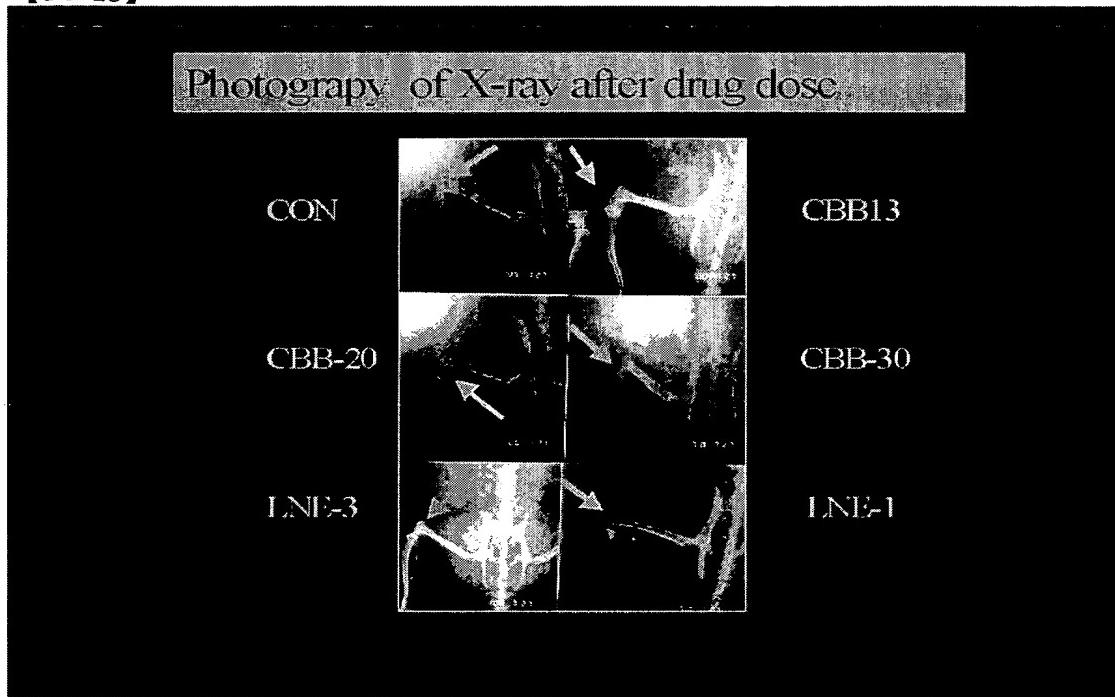


【도 12】

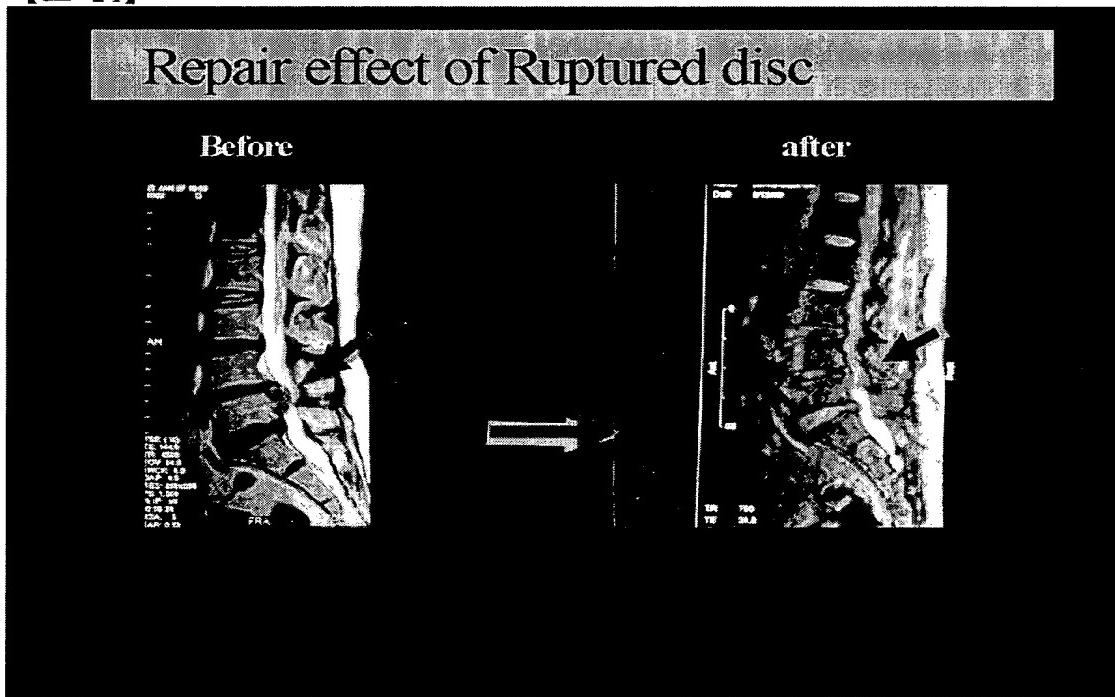
## **Immunocytochemistry of COX-II expression in synovial cell from rheumatoid arthritis patients**



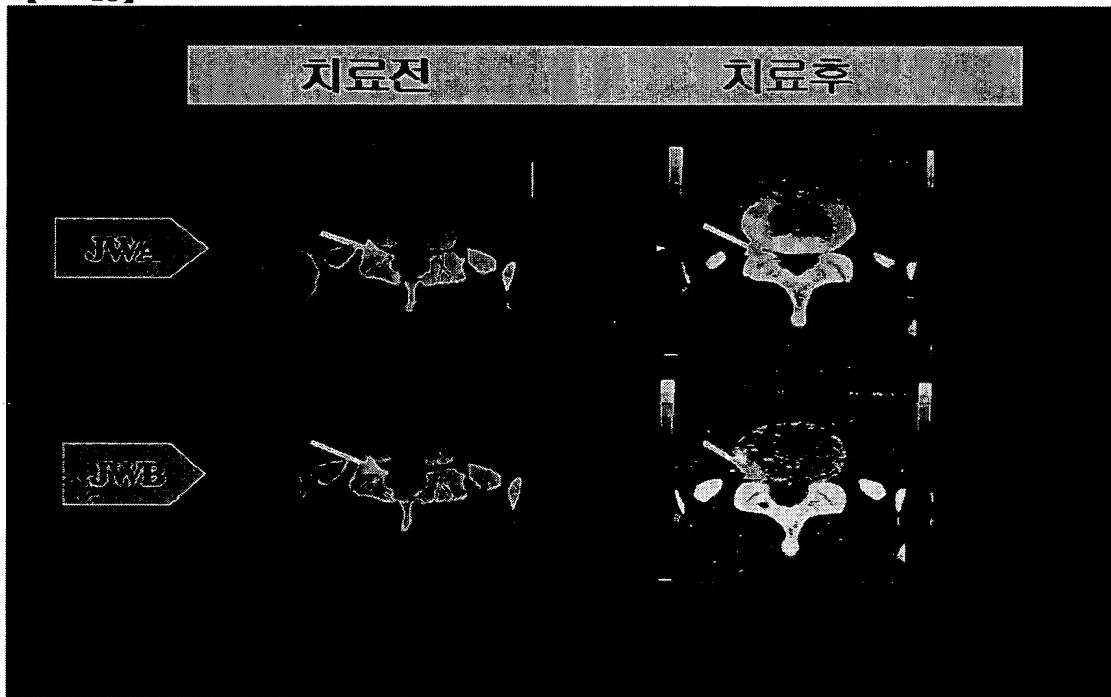
【도 13】



【도 14】



【도 15】

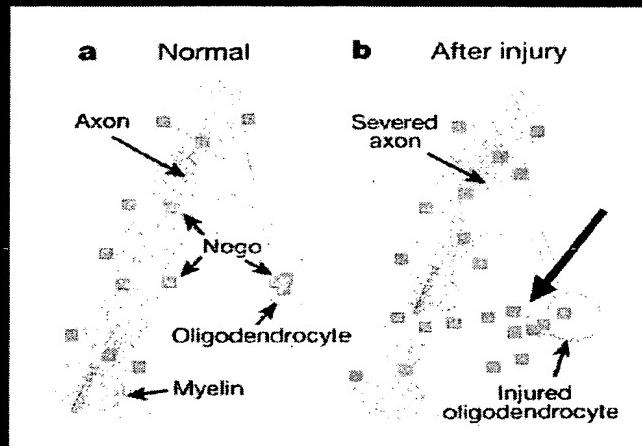


【도 16】



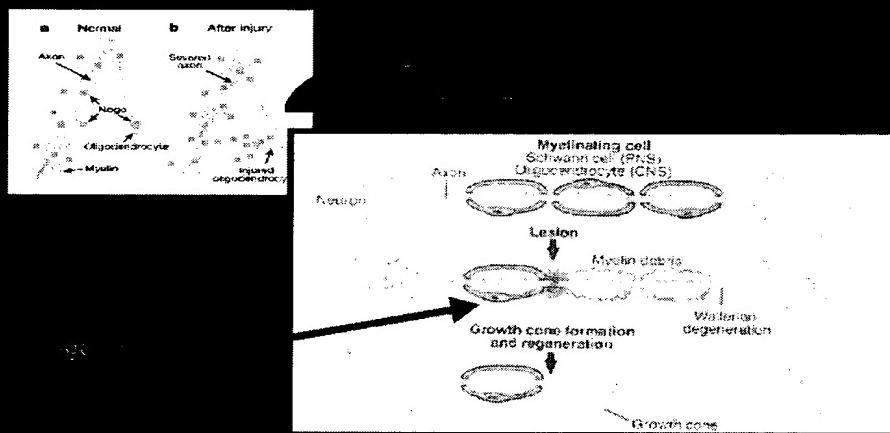
【도 17】

### Inhibition of axon degeneration



【도 18a】

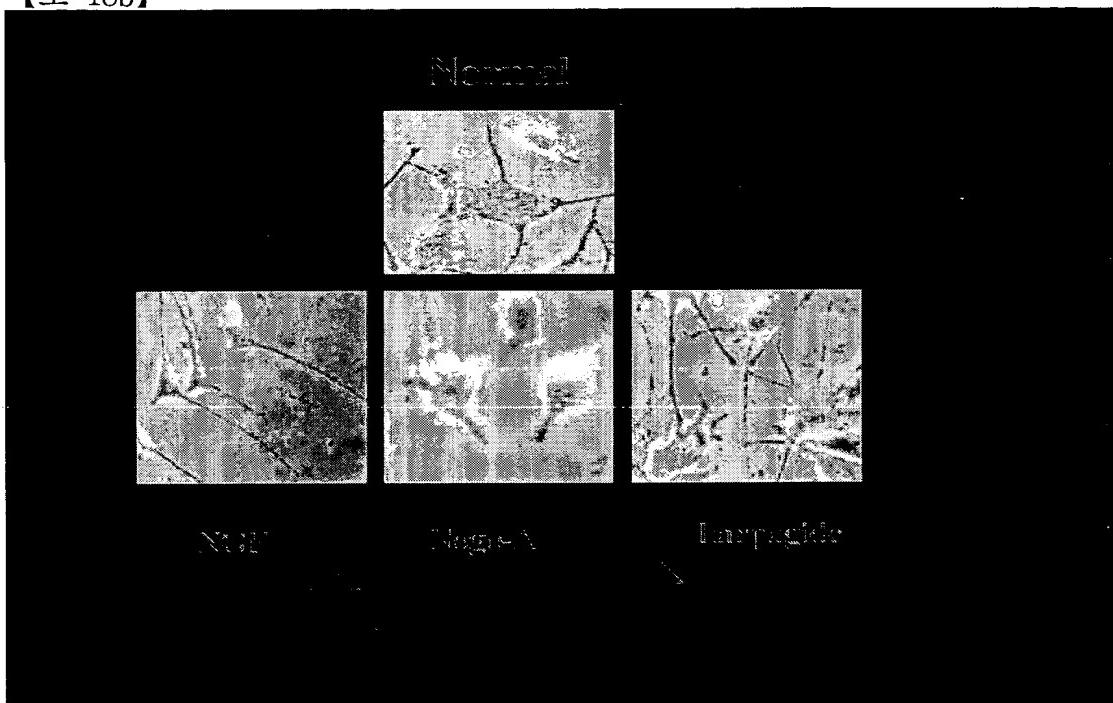
### Inhibition of axon degeneration



1020000071497

출력 일자: 2001/11/5

【도 18b】



## 【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.12.08
【출원인】	
【성명】	신준식
【출원인코드】	4-1998-022399-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	박사룡
【대리인코드】	9-1998-000198-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0071497
【출원일자】	2000.11.29
【발명의 명칭】	하르파지들관련 화합물의 골다공증, 관절염 및 디스크의 예방 과 치료제로서의 용도 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성을
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-00-0252603-02
【접수일자】	2000.11.29
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인 박사룡 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원
【첨부서류】	1. 기타첨부서류_1통[보정된 명세서]

1020000071497

출력 일자: 2001/11/5

1020000071497

출력 일자: 2001/11/5

【보정대상항목】 식별번호 15

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 15은 의약 조성물을 내원환자의 disc 환자를 대상으로 임상적인 개선효과를  
MRI 촬영한 결과이다.

## 【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.01.17
【출원인】	
【성명】	신준식
【출원인코드】	4-1998-022399-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	박사룡
【대리인코드】	9-1998-000198-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0071497
【출원일자】	2000.11.29
【심사청구일자】	2000.12.08
【발명의 명칭】	하르파지드관련 화합물의 골다공증, 관절염 및 디스크의 예방 과 치료제로써의 용도 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성을
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-00-0252603-02
【접수일자】	2000.11.29
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명】	신준식
【출원인코드】	4-1998-022399-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김상태
【성명의 영문표기】	KIM,Sang-Tae
【주민등록번호】	620321-1898824
【우편번호】	132-030

【주소】 서울특별시 도봉구 쌍문동 349-15 두산그린빌  
라 401호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 한용남

【성명의 영문표기】 HAN, Yong-Nam

【주민등록번호】 450428-1010016

【우편번호】 463-060

【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동132 아름마을  
306-1101

【국적】 KR

【취지】 특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이  
제출합니다. 대리인  
박사릉 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 원

【합계】 0 원